

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-  
Maximilians- Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck**

**Die Bedeutung des endogenen NO- Synthase  
Inhibitors ADMA auf die Aktivierung von humanen  
Dendritischen Zellen**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Vorgelegt von Sarika Jankl  
aus München  
2012**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians - Universität München**

**Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Weis**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Weber  
Prof. Dr. Clemens von Schacky auf Schönfeld**

**Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Sieglinde Kofler**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2012**

**Für meine liebe Großmutter Muhme und meine beiden Töchter Nalini und  
Anisha**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Atherosklerose .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Atherosklerose und das Immunsystem .....	8
1.1.2 Atherosklerose – eine Autoimmunkrankheit.....	10
1.1.3 Pathogenese der Atherosklerose und Entstehung atherosklerotischer Plaques .....	11
<b>1.2 Immunologie .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Dendritische Zellen (DZ) .....	14
1.2.2 Entstehung von DZ aus verschiedenen Vorläufer Zellen .....	15
1.2.3 Unterschied zwischen myeloiden und plasmazytoiden DZ .....	16
1.2.4 Differenzierung von DZ .....	17
1.2.5 Dendritische Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose .....	19
1.2.6 Aktivierung von T-Lymphozyten .....	21
<b>1.3. Das ADMA / DDAH-System .....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Das Endothel und seine Funktionen .....	23
1.3.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Botenstoff.....	25
1.3.2.1 Synthese von NO durch die NO-Synthasen .....	26
1.3.2.2 Die NO-Synthase.....	26
1.3.2.3 Vaskuloprotektive Wirkungen von NO .....	28
1.3.3 ADMA - ein Risikofaktor für Atherosklerose .....	29
1.3.3.1 Bildung und Metabolismus von ADMA ( <i>Abb. 13</i> ).....	32
1.3.3.2 Das Enzym Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) .....	33
<b>1.4 Ziele der Studie .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>36</b>
2.1.1 Zelllinien .....	36
2.1.1.1 Humane Zelllinien .....	36
2.1.1.2 Murine Zellen.....	36
2.1.2 Oligonukleotide .....	36
2.1.3 Antiseren.....	37
2.1.3.1 Primäre Antikörper.....	37
2.1.3.1.1 Für Westernblot .....	37
2.1.3.1.2 Für FACS- Analyse humaner Zellen .....	37
2.1.3.1.3 Für FACS- Analyse muriner Zellen .....	39
2.1.3.2 Sekundäre Antikörper.....	39
2.1.3.2.1 Für Westernblot: .....	39
2.1.3.2.2 Für FACS- Analyse humaner Zellen .....	40
2.1.3.2.3 Für FACS- Analyse muriner Zellen .....	40
2.1.3.3 Molekulargewichtsmarker.....	40
2.1.4 Nährmedien und Zusätze für Zellkultur .....	40
2.1.5 Antibiotika und Zytokine .....	41
2.1.6 Stimulantien für Zellkultur.....	41
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	42

2.1.7.1 Puffer für analytische und präparative Auftrennung von DNA .....	42
2.1.7.3 Puffer für die Fluoreszenzfärbung .....	43
2.1.8 Lösungen für die Proteinlyse und Proteinbestimmung .....	43
2.1.9 Chemikalien .....	43
2.1.10 Kits .....	44
2.1.11 Geräte .....	44
2.1.12 Wichtige Verbrauchsmaterialien.....	45
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.2.1 Methoden in der Zellkultur.....	47
2.2.1.1 Aufreinigung von PBMZ aus heparinisiertem Vollblut und Kultivierung von humanen dendritischen Zellen (hDZ).....	47
2.2.1.2 Zellzählung mit Trypanblau .....	48
2.2.1.3 Zellen aussäen und stimulieren .....	49
2.2.1.4 FCS Hitze inaktivieren .....	50
2.2.1.5 Kultivierung und Passage muriner Endothelzellen .....	50
2.2.1.6 Präparation von murinen Knochenmarkszellen und Kultivierung von dendritischen Zellen (BMDZ).....	50
2.2.1.7 Durchflusszytometrie = Fluorescence activated cell sorting (FACS) .....	52
2.2.2 Bestimmung der freigesetzten ADMA - Konzentration mittels ELISA.....	56
2.2.2.1 ADMA Freisetzung aus humanen DZ durch oxidativen Stress und TNF $\alpha$ .....	58
2.2.2.2 Messung der Aktivität des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH ...	58
2.2.2.3 Inkubation dendritischer Zellen mit ADMA.....	59
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	59
2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten .....	59
2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Pierce in transparenten Platten.....	59
2.2.3.3 Aufbereitung der Proteinlysate für die Gelelektrophorese .....	60
2.2.3.4 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese .....	60
2.2.4 Arbeiten mit Antikörpern.....	61
2.2.4.1 Westernblot und immunologischer Nachweis eines Antigens .....	61
2.2.4.2 Erneutes Färben einer Nitrozellulose Membran .....	62
2.2.4.3 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie.....	62
2.2.5 Immunfluoreszierende Färbung muriner Zellen in Chamber Slides .....	63
2.2.6 Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mit Hilfe der semiquantitative Polymerasenketten Reaktion (PCR) .....	63
RNA- Isolierung mit RNeasy Mini Kit von Qiagen .....	65
Reverse Transkription zur cDNA- Herstellung aus RNA mit Omniscript- Kit von Qiagen .....	65
PCR .....	66
2.2.7 Bestimmung von CD3 positiven T-Zellen mit einer humanen autologen gemischten Lymphozyten Reaktion (AMLR).....	67
2.2.8 Bestimmung der Phagozytose- Aktivität DZ.....	67
2.2.8.1 Humane DZ .....	67
2.2.8.2 Murine BMDZ .....	68
2.2.9 Vaskuläre Invasion muriner DDAH-1 über exprimierter BMDZ .....	68
2.2.10 Statistik .....	70
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Charakterisierung humaner myeloider DZ aus Vollblut gesunder Probanden .....</b>	<b>71</b>

3.1.1 Expression von typischen dendritischen Zellmarkern unter dem Einfluss von ADMA.....	73
<b>3.2 Einfluss von ADMA auf die Phagozytose- Aktivität und endozytotische Moleküle humaner DZ .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 Rezeptorvermittelte Phagozytose .....	74
3.2.2 Makropinozytose .....	75
3.2.3 Expression verschiedener Scavenger Rezeptoren, wie CD36, LOX-1, Dec205 und des Mannose Rezeptors .....	76
<b>3.3 Reduktion der DZ-Phagozytose durch spezielle Inhibitoren .....</b>	<b>77</b>
3.3.1 Reduktion der rezeptorvermittelten Phagozytose durch Mannan.....	77
3.3.2 Reduktion der Makropinozytose durch pCMBS .....	78
<b>3.4 Auswirkung von oxidativem Stress und Inflammation auf DZ .....</b>	<b>79</b>
3.4.1 Freisetzung von ADMA aus DZ unter oxidativem Stress und TNF $\alpha$ .....	79
3.4.2 Bestimmung der DDAH- Aktivität unter oxidativem Stress und Inflammation .....	80
<b>3.5 Zytokin induzierte Expression von NO .....</b>	<b>81</b>
3.5.1 Zeitabhängige Induktion der iNOS Expression durch IL-1 $\beta$ .....	81
3.5.2 Zeitabhängige Reduktion von ADMA durch IL-1 $\beta$ .....	82
3.5.3 Konzentrationsabhängige Reduktion der iNOS Expression durch ADMA....	83
3.5.4 Nachweis von iNOS auf DNA-Ebene .....	84
<b>3.6 Aktivierung von CD3 positiven T-Zellen durch ADMA .....</b>	<b>85</b>
<b>3.7 Die Bedeutung von DDAH auf die Aktivierung muriner DZ. ....</b>	<b>88</b>
3.7.1 FACS- Analyse muriner Knochenmarkszellen .....	88
3.7.2 Charakterisierung von DDAH-1 überexprimierten BMZ und BMDZ .....	88
3.7.3 Charakterisierung von Wildtyp- und DDAH-1 über exprimierten BMDZ .....	89
3.7.4 Vaskuläre Invasion von murinen DDAH-1 über exprimierten BMDZ .....	90
3.7.5 Phagozytotische Aktivität von murinen DDAH- überexprimierten BMDZ .....	92
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Charakterisierung humaner myeloider DZ aus Vollblut .....</b>	<b>93</b>
4.1.1 Einfluss von ADMA auf die Phagozytose- Aktivität und endozytotische Moleküle humaner DZ.....	95
4.1.2 Aktivierung von CD3 positiven T-Zellen durch ADMA.....	96
<b>4.2 Auswirkung von oxidativem Stress und Inflammation auf humane DZ.....</b>	<b>97</b>
<b>4.3 Zytokin induzierte Expression von NO .....</b>	<b>98</b>
<b>4.4 Die Bedeutung von DDAH auf die Aktivierung muriner DZ .....</b>	<b>100</b>
<b>4.5 Die Rolle des ADMA/NO-Systems für die Immunregulation .....</b>	<b>101</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>108</b>

<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische, entzündliche und multifaktorielle Erkrankung der Gefäßwand, die klinisch u.a. in der Manifestation der koronaren Herzerkrankung oder des akuten Koronarsyndroms (instabile Angina Pectoris, Nicht-ST-Hebungsinfarkt, klassischer ST-Hebungsinfarkt) kulminiert. Ungefähr 50 % aller Todes- und Erkrankungsfälle in den westlichen Industrieländern sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurück zu führen [1]. Atherosklerose ist eine komplexe Krankheit, deren Anzeichen schon im Jugendalter beginnen, aber erst mit zunehmendem Alter klinisch relevant werden. Aus epidemiologischen Studien weiß man heute, dass sowohl umweltbedingte Einflüsse, als auch genetische Risikofaktoren bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine bedeutende Rolle spielen [2, 3]. Atherosklerose resultiert aus Störungen des Lipidmetabolismus, zellulärer Interaktionen, Blutcoagulations-Elementen, Zytokinen und hämodynamischem Stress. Traditionelle Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, inhalatives Zigarettenrauchen und Diabetes mellitus tragen mit ca. 80% zur Entstehung koronarer Ereignisse bei [4]. Humorale und zelluläre Immunreaktionen welche durch o.g. Ereignisse aber auch durch Fremd- und Autoantigene (z.B. Hitzeschockproteine (HSP), oxidiertes LDL (oxLDL)) getriggert werden sind Schlüsselereignisse in der Atherogenese. Die Balance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Stimuli ist dabei von großer Bedeutung.

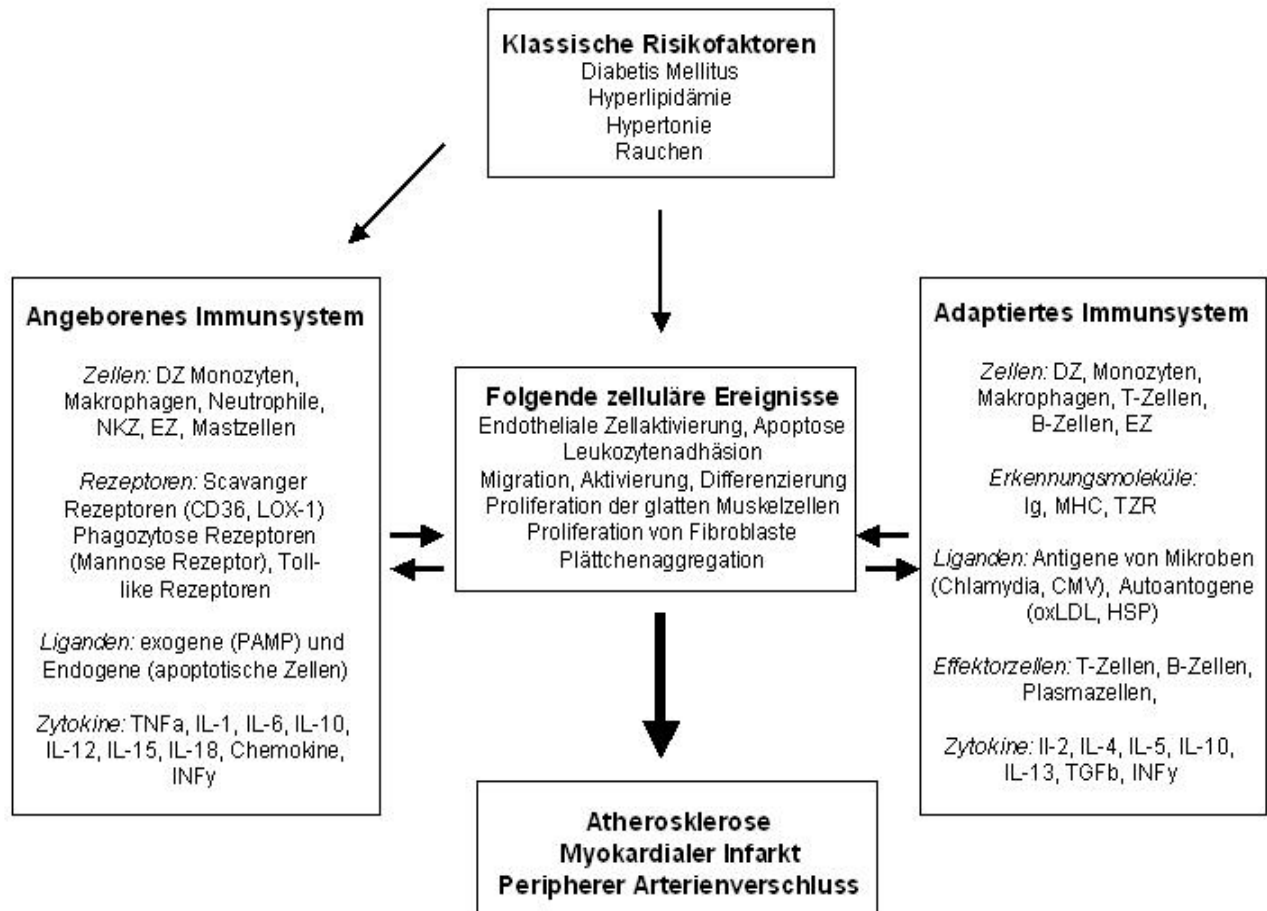
### 1.1.1 Atherosklerose und das Immunsystem

Während des 19. Jahrhunderts beschrieben die Pathologen Rokitansky und Virchow zelluläre, inflammatorische Vorgänge in der atherosklerotischen Gefäßwand [5]. Heute weiß man, dass das angeborene und adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose spielen [6]. In *Abb. 1* ist der Zusammenhang zwischen angeborener und adaptierter Immunität während der Atherogenese vereinfacht dargestellt. Atherosklerotische Läsionen sind durch die Akkumulation von Lipidpartikeln und Immunzellen sowie vaskulärer Inflammation



charakterisiert und können durch Plaque Ruptur und Thrombose zu akuten Gefäßverschlüssen führen. An diesem Prozess sind Autoantigene (oxLDL, HSP) genauso beteiligt wie inflammatorische Zellen, wie Monozyten, Dendritische Zellen (DZ), Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, Killerzellen (NKZ) und Mastzellen [6].

Das angeborene Immunsystem ist wichtig für den Beginn einer inflammatorischen Antwort. Es besteht aus epithelialen und endothelialen Barrieren, zirkulierenden Zellen und Proteinen, welche Mikroben oder infektiöse Partikel erkennen und deren Eliminierung einleiten. Bedeutende Erkennungsmoleküle sind Scavenger Rezeptoren, der Mannose Rezeptor, Rezeptoren für Opsonine und Toll-like Rezeptoren (TLR). Auf DZ, welche sowohl in der angeborenen, als auch adaptiven Immunität eine zentrale Rolle spielen, wird später noch ausführlich eingegangen. Das adaptive Immunsystem könnte die Pathogenese der Atherosklerose auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen. Zum einen durch Zell-Zell Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen (insbesondere DZ und Makrophagen) und T-Zellen und zum anderen durch die Sekretion verschiedener Zytokine aktivierter T-Zellen, welche ihrerseits Plaque-invasive inflammatorische Zellen stimulieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Antikörperproduktion von B-Zellen in einer T-Zell abhängigen und- unabhängigen Weise, welche zum Teil die Fähigkeit besitzen den Import von modifizierten Lipoproteinen über Makrophagen Scavenger Rezeptoren, zu blockieren.



**Abbildung 1: Rolle der angeborenen und adaptierten Immunität während der Atherogenese.** DZ= dendritische Zellen, NKZ= Natural Killer Zellen, EZ= Endothelzellen, PAMP= Pathogen-Associated Molecular Pattern, Ig= Immunglobulin, MHC= Major Histocompatibility Complex, TZR= T-Zell Rezeptor, CMV= Cytomegalovirus, HSP= Hitzeschockprotein, oxLDL= oxidiertes LDL (nach Methe 2007, [6]).

### 1.1.2 Atherosklerose – eine Autoimmunerkrankung

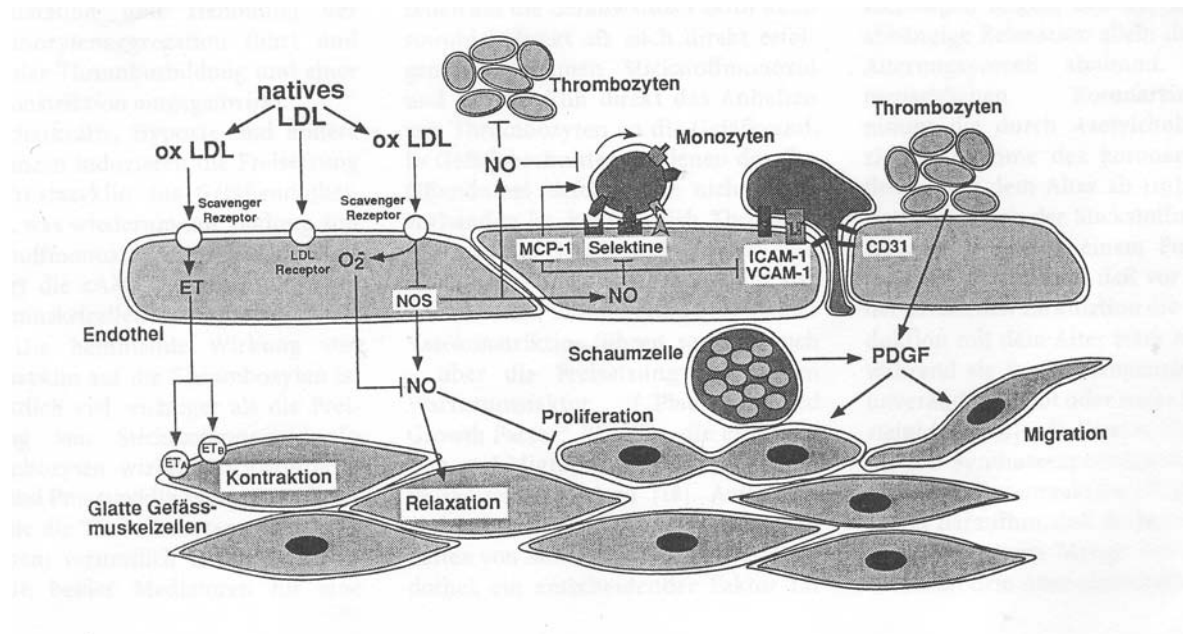
Mittlerweile gibt es Hinweise, dass die Atherosklerose eine Autoimmunerkrankung ist. So postulierten Wick und Mitarbeiter eine plausible Hypothese: In der normalen arteriellen Intima formen subendotheliale Akkumulationen immunkompetenter Zellen und Antigen präsentierender Zellen das sogenannte „vascular- associated lymphoid tissue“ (VALT), welches seine Mikroumgebung nach schädlichen Antigenen absucht. Eine Destabilisierung dieses Gewebes durch Autoantigene (und Erkennung derselben durch DZ) ist für den Beginn einer Immunantwort, welche zur Entwicklung

atherosklerotischer Plaques führt, verantwortlich. Die Destabilisierung von VALT findet an Stellen der Intima mit großem hämodynamischen Stress statt, welche deshalb für eine Plaquebildung begünstigt sind [7]. Zusätzlich bilden klassische Risikofaktoren der Atherogenese Stressfaktoren für das Endothel, welches daraufhin vermehrt Stressproteine, wie Hitzeschockproteine und Adhäsionsmoleküle exprimiert. Die Möglichkeit, dass Hitzeschockproteine an Peptide gebunden sind die mit Antigen präsentierenden Zellen interagieren und somit zu einer Stimulation proinflammatorischer Zytokine führen, macht DZ zu einem bedeutenden Startpunkt der Immunantwort. Letzendlich sind die Auswirkungen einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort auf das Endothelsystem (Induktion einer Endothelzellaktivierung- dysfunktion) Schlüsselemente in der Pathogenese der Atherosklerose (*Abb. 1*)[3].

### **1.1.3 Pathogenese der Atherosklerose und Entstehung atherosklerotischer Plaques**

In *Abb. 2* ist schematisch dargestellt wie nach derzeitigem Stand die Pathogenese der Atherosklerose vermutlich abläuft. Die Struktur der kardialen Gefäßwände, aber auch aller anderen Kreislaufareale, werden entscheidend von endothelabhängigen Faktoren beeinflusst. Das Gefäßendothel steuert die Struktur und Funktion der Gefäßwand und verhindert unkontrolliertes Wachstum der glatten Muskelzellen. Eine Verletzung oder Entfernung dieses Endothels führt zur sofortigen Ablagerung von Thrombozyten und Leukozyten. Es folgt eine Dysfunktionalität des Gefäßendothels, welche ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Atherosklerose ist. Humane atherosklerotische Plaques bestehen aus Blut abstammenden Immunzellen, vaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen, extrazellulärer Matrix, Lipiden und nicht zellulären lipidreichen Partikeln. Diese Läsionen zeigen eine typisch asymmetrische lokale Verdickung der Intima, dem Hauptbestandteil einer Arterie [8]. Der atherosklerotische Prozess beginnt, sobald sich cholesterinreiche „low- density“ Lipoproteine in der Intima, ansammeln und das Endothel durch freigesetzte inflammatorische Stimuli aktivieren. Neben nativem LDL spielt Lipoprotein A (Lpa) eine wichtige Rolle, bei der Bildung der extrazellulären Matrix. Beide atherogenen Lipoproteine unterlaufen chemischen Modifikationen, wie der Oxidation von LDL in

der Gefäßwand und lösen dadurch eine Kette von Reaktionen aus, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch genauer erläutert werden [9, 10].



**Abbildung 2: Pathogenese der Atherosklerose.** Die Oxidation von nativem LDL und die Akkumulation von oxidiertem LDL löst eine Kette von Mechanismen aus, die zur Entstehung der Atherosklerose beitragen (nach Lüscher et al. 1997, [10]).

Alle Stadien der koronaren Herzerkrankung stehen in engem kausalem Zusammenhang mit der vaskulären Inflammation. Dabei spielt die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut in die atherosklerotischen Plaques eine erhebliche Rolle bei deren Progression und Destabilisation [11]. Histomorphologisch zeigen atherosklerotische Läsionen massive Infiltrationen von T-Zellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, jedoch nur wenige Mastzellen und DZ [12]. Die Entstehung atherosklerotischer Plaques teilt sich in drei Stadien auf [13]:

### *Rekrutierung von inflammatorischen Zellen*

Die vermehrte Ansammlung von LDL ist mit einer verstärkten Leukozyten Anlagerung an das Endothel verbunden, welche in der Leukozytendiapedese endet und die inflammatorische Immunantwort vorantreibt. Monozyten, die mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in die Gefäßwand eindringen differenzieren schnell zu Gewebemakrophagen, von denen wiederum ein Großteil durch die

Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen und oxidiertem LDL in sogenannte Schaumzellen transformieren. Diese Schaumzellen werden innerhalb der Läsionen aktiviert eine große Anzahl spezifischer Faktoren freizusetzen, welche im atherogenen Prozess eine wichtige Rolle spielen. Zusätzlich führt die Freisetzung weiteren pro-atherogenen Faktoren wie Endothelin-1 (ET-1) und Superoxidanionen, welche NO inaktivieren, zu sekundären Gefäßwandschäden.

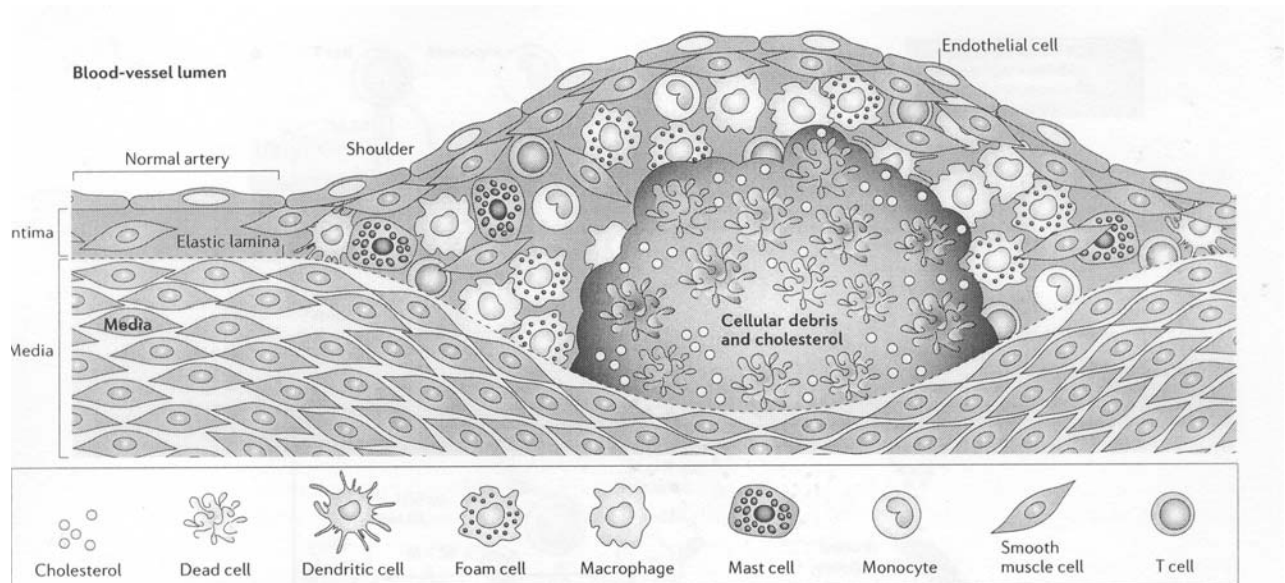
### *Plaque Progression*

Im weiteren Verlauf transformieren intimale Läsionen, mit sogenannte „Fatty Streaks“, welche durch lipid-geladene Makrophagen, aber auch T-Zellen, DZ und Mastzellen charakterisiert sind, später zu atherosklerotischen Plaques. Diese „Fatty Streaks“ findet man bereits bei jungen Menschen, bei denen sie jedoch noch keine Symptome zeigen, sondern erst mit zunehmendem Alter in ihrer Entwicklung voranschreiten [3, 14]. Das eigentliche Atherom ist strukturell viel komplexer aufgebaut als die „Fatty Streaks.“ In dessen Zentrum formen Schaumzellen, tote Zellen und extrazelluläre Lipidpartikel eine Kernregion, die von einer stabilisierenden Kappe aus glatten Muskelzellen und kollagenreicher Matrix, umgeben ist. Immunkompetente Zellen infiltrieren die Läsion im Bereich der Schulterregion, in der das Atherom stetig wächst, und dem Zwischenraum von Kappe und Kern. Dort sind die Immunzellen aktiviert und produzieren pro-inflammatorische Zytokine. Man unterscheidet zwei Arten von Plaques. Den stabilen Plaque, gekennzeichnet durch einen kleinen Lipidkern mit einer dicken fibromuskulären Kappe aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix. Der instabile oder vulnerable Plaque besitzt einen großen Lipidkern mit einer dünnen Kappe und vielen inflammatorischen Zellen, vor allem im Bereich der Schulter [9, 14].

### *Plaque Ruptur*

Zur Ruptur oder Thrombose kommt es, wenn derartige Läsionen den Blutstrom durch die Bildung von Thromben oder Blutagglutinationen blockieren, oder aktivierte Immunzellen pro-inflammatorische Zytokine sezernieren, welche die Kollagen Formation zerstören und die Expression von Gewebefaktoren induzieren. Zusätzlich greifen die von Immunzellen freigesetzten Proteasen die Kollagenkappe an, und machen diese brüchig. Der geschwächte Plaque kann durch die Kraft des arteriellen Blutstroms reißen und es kommt zur letalen Ruptur. Die in das Arterienlumen

ausgestoßenen subendothelialen Strukturen, aber auch Procoagulantien führen zur Plättchenaggregation und letztendlich zur Thrombose mit akuter Ischämie als Folge [8].



**Abbildung 3: Zelluläre Zusammensetzung eines atherosklerotischen Plaques.**

Ein atherosklerotischer Plaque besitzt einen Kern mit Lipiden und Zellmaterial toter Zellen. Er ist umgeben von einer fibrösen Kappe, bestehend aus glatten Muskelzellen und Kollagenfasern. Immunzellen infiltrieren den Plaque und produzieren im aktiven Stadium Zytokine, Proteasen, prothrombotische Moleküle und vasoaktive Substanzen, die eine Inflammation auslösen können (nach Hansson 2006, [8]).

## 1.2 Immunologie

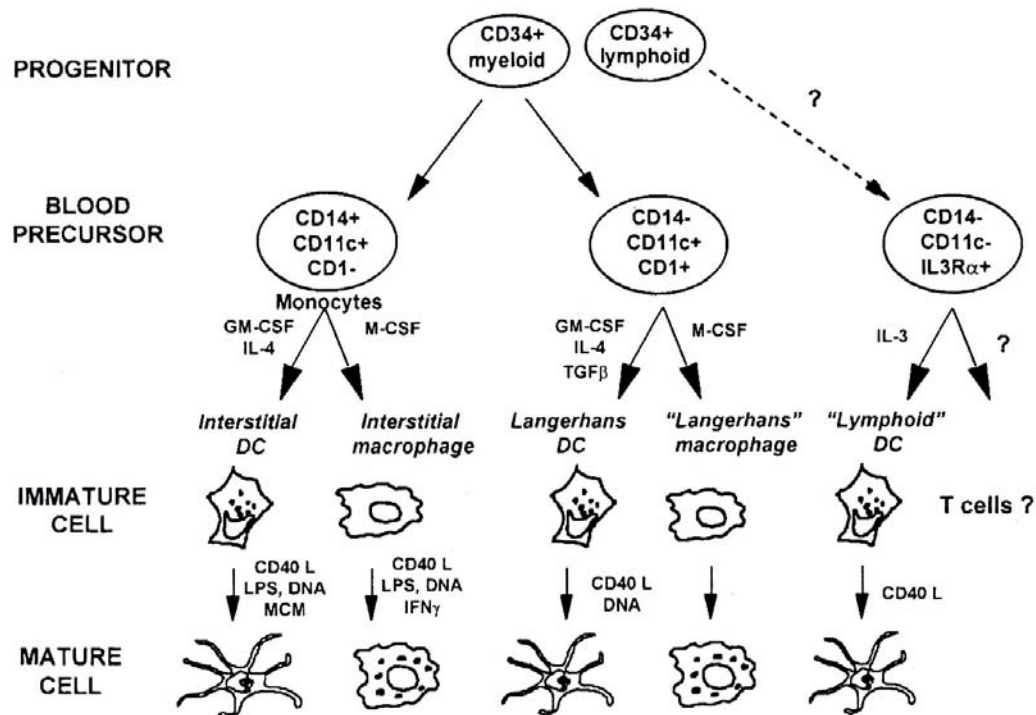
### 1.2.1 Dendritische Zellen (DZ)

Das Immunsystem der Vertebraten besitzt drei verschiedene Mechanismen um auf infektiöse Veränderungen zu antworten, ohne dabei Eigengewebe zu zerstören. Die schnelle Abwehr von Krankheitserregern erfolgt innerhalb weniger Stunden über eine Antigen nicht spezifische angeborene Immunität und wird erst später durch die Antigen spezifische, adaptierte Immunantwort ersetzt. Die Schlüsselemente der angeborenen Immunität sind die Fähigkeit Pathogene in verletztem Gewebe sofort zu erkennen, über phagozytierende Zellen, Killerzellen, das Komplementsystem und

Interferone zu beseitigen oder entsprechende Signale an Immunzellen des adaptierten Immunsystems weiter zu leiten. Dafür sind antigenpräsentierende Zellen wie B- Lymphozyten, Makrophagen, vor allem aber DZ von großer Bedeutung. Sie sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen, da sie einzig und alleine in der Lage sind sowohl die primäre, angeborene Immunantwort zu induzieren [15], als auch die lang andauernde erworbene Immunität zu kontrollieren, welche eine Beteiligung an der Selbsttoleranz des Körpers mitführt und zusätzlich ein immunologisches Gedächtnis besitzen [16]. DZ werden daher auch als Schlüsselregulatoren der Immunreaktion bezeichnet [17].

### **1.2.2 Entstehung von DZ aus verschiedenen Vorläufer Zellen**

Mitte der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieb Ralph Steinman als Erster in der Milz vorkommende Zellen mit dendritenartiger Struktur [18]. Es waren adhärente nicht phagozytierende Zellen, welche in allen lymphoiden und fast allen nicht lymphoiden Geweben vorkamen [19]. DZ bilden eine heterogene Gruppe von Zellen, welche sich in der anatomischen Lokalisation, Zelloberfläche, Phänotyp und Funktion unterscheiden. Ursprünglich stammen sie von CD34 Knochenmarkszellen ab. Es gibt drei Untergruppen von DZ die sich einerseits aus den myeloiden und andererseits aus den lymphoiden oder plasmazytoiden CD34 positiven Vorläuferzellen ableiten. Die menschliche Haut besitzt zwei der drei Untergruppen, zum einen die Langerhanszellen und zum anderen die interstitiellen DZ, welche sich beide von den myeloiden Vorläuferzellen ableiten. Die dritte Gruppe stellen die lymphoiden DZ dar, entstanden aus den CD34 positiven lymphoiden Vorläuferzellen (s. Abb.4) [19, 20]. Diese verschiedenen Mitglieder der dendritischen Zellfamilie befinden sich in unterschiedlichen Geweben und Organen. Egal ob sie in den lymphoiden oder nicht lymphoiden Geweben vorkommen stellen sie immer eine Minderheit dar. So repräsentieren sie im Blut weniger als 0,1% der weißen Blutzellen, in der Epidermis besitzen sie einen Anteil von 3-5 % der gesamten Zellpopulation und in der Milz sind nur 1-1,6 % aller Zellen DZ [21].



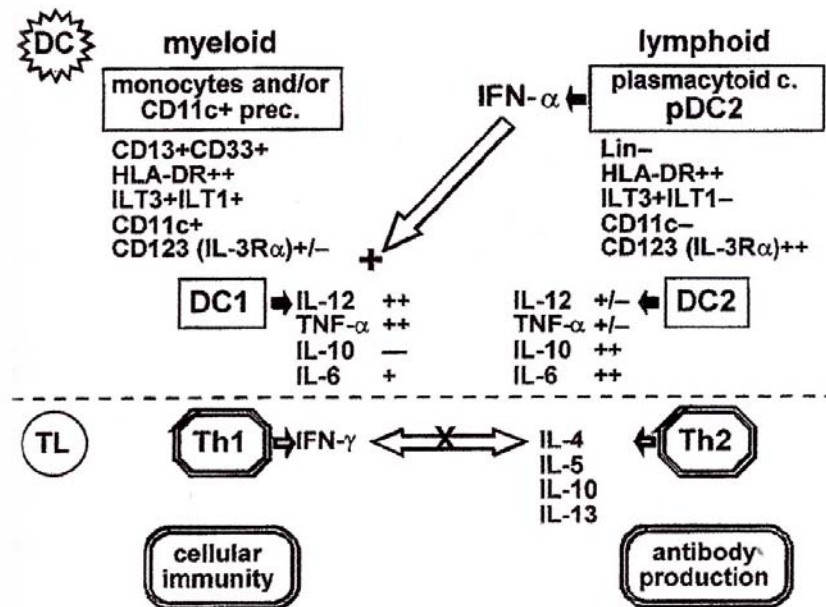
**Abbildung 4: Die drei Untergruppen humaner DZ und Makrophagen.** Entwicklung von DZ aus verschiedenen Vorläuferzellen über Blutvorläuferzellen, immature DZ bis zu murenen DZ (nach Banchereau et al., 2000, [20])

### 1.2.3 Unterschied zwischen myeloiden und plasmazytoiden DZ

Plasmazytoide und myeloide DZ unterscheiden sich in Phänotyp, Lokalisation und Funktion (Abb. 5) [20]. Myeloide DZ werden als DZ-1 bezeichnet und stammen von CD11c<sup>+</sup> Vorläufern oder Monozyten ab. Neben CD11c und einer stark ausgeprägten Expression von HLA-DR zeigen sie die typischen myeloiden Marker CD13/CD33, sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86. Durch ihre Aktivierung produzieren sie IL-12, welches T-Lymphozyten zu einer Th1 Antwort anregt, die ihrerseits INF $\gamma$  sezernieren und die zell-vermittelte Immunreaktion auslösen. Die Vorläufer der als DZ-2 bezeichneten lymphoiden DZ sind plasmazytoide Zellen aus Blut und lymphoidem Geweben. Sie exprimieren ebenfalls HLA-DR, jedoch kein CD11c. Als Antwort auf Virusinfektionen produzieren sie INF $\alpha$ . Werden sie aktiviert sezernieren sie IL-10 und IL-6 und induzieren damit die Th2 Immunantwort verbunden mit Antikörperproduktion, und in einigen Fällen auch Toleranz [22]. Beide



T-Zell Typen sind in der Lage sich über ihre sezernierten Interleukine gegenseitig negativ zu regulieren.

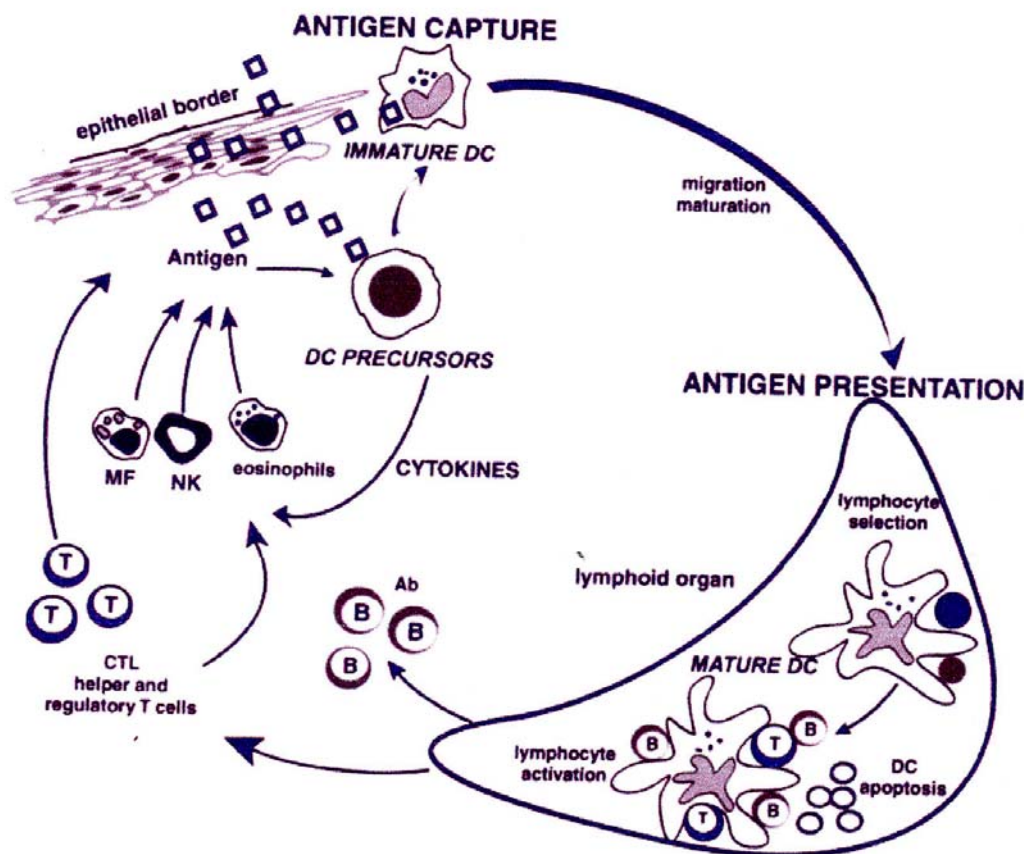


**Abbildung 5: Unterschied zwischen myeloiden und plasmazytoiden DZ.** (nach Gluckman et al., 2002, [22])

#### 1.2.4 Differenzierung von DZ

Der Lebenszyklus dendritischer Zellen [23], d.h. die Differenzierung von immaturren zu matten DZ ist ein komplexer Prozess der in Abb. 6 vereinfacht dargestellt ist. Abstammend von CD34+ myeloiden Progenitorzellen im Knochenmark, wandern immature DZ über den Blutstrom mit Hilfe von Selektinen, welche an bestimmte Karbohydrate auf spezialisierten Zelloberflächenmolekülen auf dem Endothel binden, in das Gewebe ein. Im Gewebe binden DZ mit ihrem glykosylierten P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 an P- und E-Selektine auf Endothelzellen, welche durch inflammatorische Stimuli hochreguliert werden. An diesen rollen sie entlang bis zu dem verletzten Gewebe, um dort das fremde Antigen zu phagozytieren. An der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe sind neben den inflammatorischen Zytokinen ebenso Adhäsionsmoleküle beteiligt. [24], [25]. In diesem Stadium sind DZ in der Lage eine große Anzahl von Antigenen aufzunehmen und zu prozessieren. Aktiviert durch Pathogene oder Gewebeschäden, wandern sie

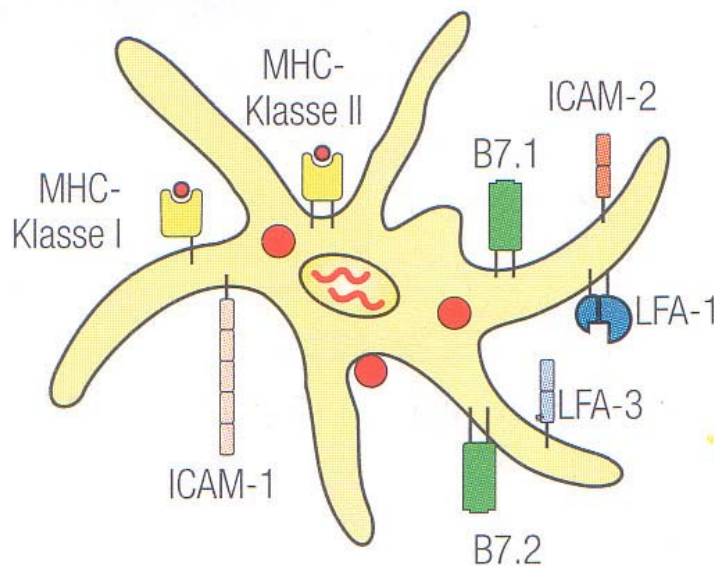
durch Chemokin-Chemokin Rezeptorpaare durch die Lymphbahnen oder den Blutstrom in lymphoide Organe und die T-Zell Areale der Lymphknoten, wodurch ihre Reifung vollendet wird. Durch die Interaktion mit T-Lymphozyten verlieren sie ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen, gewinnen aber gleichzeitig die Eigenschaft Antigene vor allem naiven CD4+ T-Helferzellen, über den MHC-II Komplex aber auch CD8+ zytotoxischen T-Zellen, über MHC-I - Moleküle effektiv zu präsentieren [22].



**Abbildung 6: Lebenszyklus von humanen DZ.** Zirkulierende Vorläufer-DZ dringen als immature DZ in das Gewebe ein, nehmen Antigene auf und migrieren in die lymphatischen Organe. Als mature DZ exprimieren sie MHC- Moleküle und präsentieren naiven T-Zellen Fremdantigene, welche sich zu spezifischen Effektorzellen entwickeln (nach Banchereau et al. 2000, [20]).

Zusätzlich exprimieren sie in diesem Stadium große Mengen an kostimulatorischen Molekülen sowie Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 und LFA-3), welche für die Aktivierung naiver T-Zellen unablässig sind, siehe Abb.7 (Janeway Abb. 7.14 DZ im Lymphgewebe, S.252).

Nach Berührung mit bestimmten maturierenden Stimuli können DZ inflammatorische Zytokine/Chemokine, welche sie einst angelockt haben, in großen Mengen selber produzieren. Durch diesen Prozess werden einerseits neue immature DZ rekrutiert, andererseits fördert es die Herunterregulation von bestimmten Rezeptoren auf DZ, damit diese das entzündliche Gewebe wieder verlassen können [24].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer matten DZ.** Neben den beiden MHC-Molekülen, Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1/2 und LFA-1/3 exprimiert sie ebenso die kostimulatorische Moleküle B7.1/B7.2.

### 1.2.5 Dendritische Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische Erkrankung der Gefäßwände und betrifft wie oben bereits ausgeführt verschiedene Zellsysteme und Mediatoren. Ihre Pathogenese umfasst inflammatorische Zellen, systemische Marker und pro-inflammatorische Signalwege [26]. Atherosklerose beginnt als eine inflammatorische immunologische Krankheit, welche auf eine autoimmune Reaktion zurück zu führen ist, basierend auf einer humoralen und zellulären Immunität gegen mikrobiell-humane kreuzreaktive Epitope der Hitzeschock Proteine. Neben den Hitzeschockproteinen, welche von aktivierten DZ exprimiert werden und zur T-Zell Aktivierung führen spielen noch weitere Antigene für die zelluläre Immunantwort der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Genannt seien hier denaturierte Makromoleküle aus Plaquematerial, Antigene infektiöser Organismen, wie Herpes Virus,

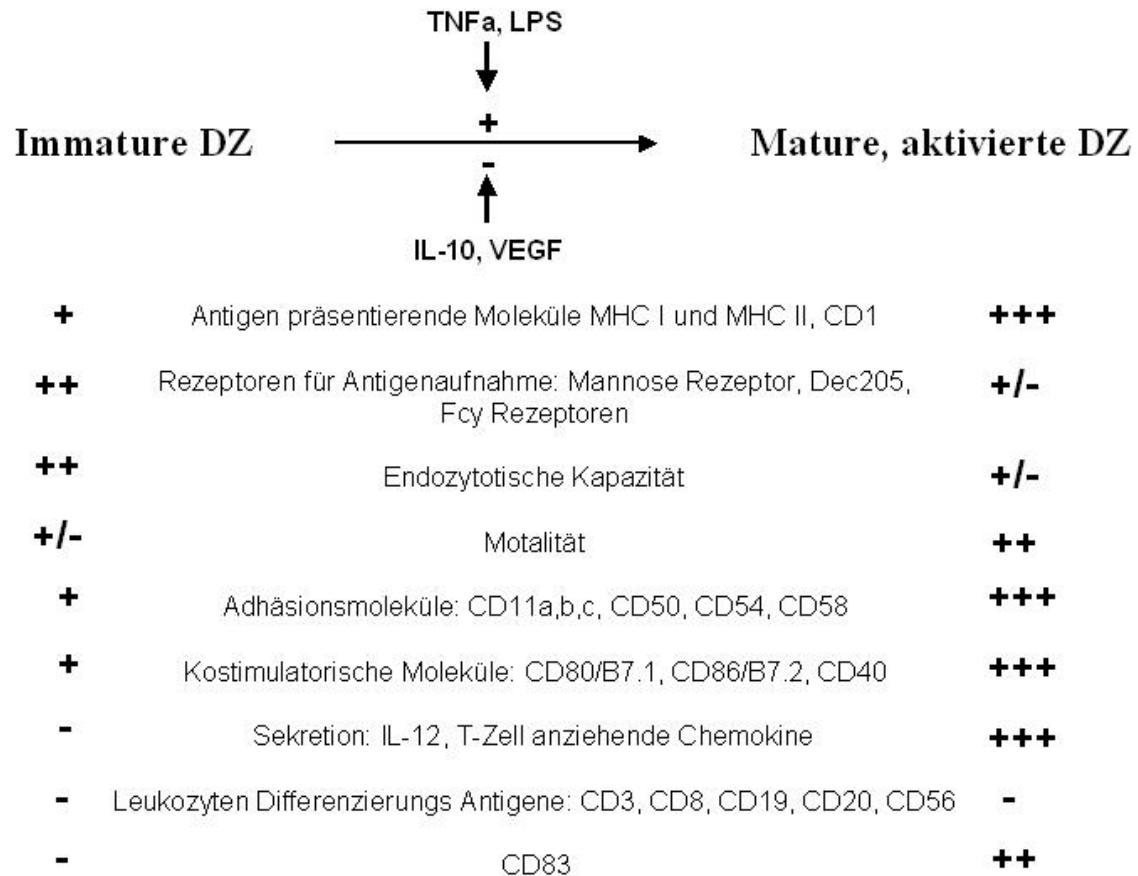
Cytomegalovirus und Chlamydia pneumoniae, aber auch modifizierte Lipoproteine wie oxidiertes LDL. Letzteres induziert DZ zur Aktivierung und Maturierung mit der Folge der T-Zell Aktivierung und Proliferation [27]. Sowohl in frühen als auch späten Läsionen kommt es zur Akkumulation von Makrophagen, T-Zellen, DZ und Mastzellen [28], [29]. Millonig und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass die Infiltration von mononukleären Zellen nicht nur die frühen und späten Läsionen atherosklerotischer Plaques betrifft, sondern auch Arterien von Kindern und Jugendlichen mit besonders großem hämodynamischen Stress, welche für die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques im späteren Leben prädisponiert sind. Sie fanden dort ähnlich wie in einem atherosklerotischen Plaque aktivierte T-Zellen, Makrophagen, DZ, Mastzellen und einige wenige Killer- oder B-Zellen [28].

Da die Anzahl dendritischer Zellen in atherosklerotischen Arterien ständig ansteigt geht man heute davon aus, dass DZ eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Atherosklerose spielen [30]. Zum einen werden die in der Intima befindlichen vaskulären DZ aktiviert und zum anderen wandern DZ aus der Adventitia in die atherosklerotischen Plaques vermehrt ein. Außerdem können die im frühen Stadium der Atherosklerose in die Intima infiltrierten Monozyten ebenfalls zu einem erhöhten Zuwachs der DZ-Population führen [31]. Die Adhäsion und Migration von DZ wird durch die Induktion endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie chemischer Lockstoffe, ausgelöst und durch die Oxidation von Lipoproteinen, beeinflusst [3]. Weis und Mitarbeiter fanden heraus, dass Stimuli, welche erheblich die Atherogenese beschleunigen, zu einer erhöhten Adhäsions- und Migrationfähigkeit DZ führen. Dabei zeigen myeloide und plasmazytoide DZ fundamentale Unterschiede in ihrer Fähigkeit zu migrieren. Myeloide DZ sind in der Lage ohne jegliche Unterstützung chemotaktischer Moleküle spontan und eigenständig zu migrieren. Sie reagieren außerordentlich stark auf inflammatorische und homeostatische Chemokine. Plasmazytoiden DZ fehlt die Fähigkeit der eigenständigen Migration. Sie sind auf die Unterstützung des Endothels und dessen Moleküle angewiesen [32]. Die Aktivierung des Endothels, aber auch die Blockierung der NO-Synthase durch den endogenen NO-Synthase Inhibitor Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) führt zur verstärkten Adhäsion und Migration von DZ [33]. Endotheliale Aktivierung beschleunigt DZ-vermittelte Immunaktivierung, letztendlich erhöht sie die vaskuläre Inflammation [26]. DZ spielen in der arteriellen Gefäßwand eine wichtige Rolle bei der Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und letztendlich

bei der Antigenpräsentation über ihre MHC-Moleküle. In atherosklerotischen Läsionen sind mehr als 90 % DZ lokalisiert, welche sich in einem sehr aktiven Stadium befinden und sich dort nicht nur mit T-Zellen, sondern auch mit NKT-Zellen zusammenschließen. Diese enge Formation zwischen DZ und T-Zellen und deren Zellprodukte [34], welche über den Blutstrom in die atherosklerotischen Läsionen einwandern führen zur Plaque Destabilisation, [35].

### 1.2.6 Aktivierung von T-Lymphozyten

Immature und mature DZ unterscheiden sich in ihrer Morphologie, aber auch der Expression von Oberflächenmolekülen. So exprimieren weder immature noch mature DZ zwar keine spezifischen Antigene, welche man auf B-Zellen (CD19, CD20), T-Zellen (CD3), Monozyten (CD14) und natürlichen Killerzellen (CD56) findet, jedoch zeigen mature DZ eine hohe Expression derjenigen Moleküle, welche für die Interaktion mit T-Zellen äußerst wichtig sind. Dazu gehören das Antigen präsentierende Molekül CD1, MHC-I und MHC-II Proteine, kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80/B7.1, CD86/B7.2 und Adhäsionsmoleküle wie CD11a/LFA-1, CD11b, CD11c, CD50/ICAM-3, CD54/ICAM-1 und CD58/LFA-3. CD83, ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie ist restriktiv nur auf maturen DZ zu finden. Seine Funktion ist bisher noch unbekannt [36], wird aber in der Literatur als Reifemarker für DZ beschrieben. *Abb.8* zeigt die Eigenschaften und Expression spezifischer Moleküle immaturer und maturer DZ.



**Abbildung 8: Merkmale immaturer und maturer DZ.** Die Aktivierung und funktionelle Maturierung kann durch inflammatorische Stimuli, Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden (nach Timmerman et al 1999, [36]).

Für die Aktivierung von naiven T-Zellen ist das Erkennen von fremden Peptidfragmenten, die an MHC- Moleküle der Antigen präsentierenden Zelle gebunden sind, erforderlich. Dieser erste Kontakt zwischen T-Zell Rezeptor und MHC-Molekül geschieht über die bereits genannten Adhäsionsmoleküle. Um diese Bindung zu intensivieren und eine T-Zell Aktivierung und Proliferation zu induzieren ist ein weiteres Signal, der kostimulatorischen B7 Moleküle, ausgehend von der Antigen präsentierenden Zelle, von Nöten. Diese B7 Moleküle binden an den CD28 Rezeptor der T-Zelle. Sind die T-Zellen aktiviert exprimieren sie einen weiteren Rezeptor für B7 Moleküle, CTLA-4, welcher eine vielfach stärkere Bindungsaffinität für B7.1 und B7.2 als CD28 besitzt. Dies hat einerseits zur Folge, dass aktivierte Nachkommen einer naiven T-Zelle weniger empfänglich sind für eine Stimulierung durch Antigen präsentierende Zellen und andererseits limitiert es die Produktion des

T-Zell Wachstumsfaktors IL-2, so dass die proliferative Antwort aktivierter T-Zellen begrenzt wird.

Aufgrund ihrer hohen Dichte an MHC-II Oberflächenmolekülen sowie kostimulatorischen, als auch Adhäsionsmolekülen stellen mature DZ die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen dar [37]. Als mature DZ verlieren sie die Kapazität der Antigenaufnahme, bei gleichzeitig verstärkter Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen. Dadurch kommt es zu einer Stabilisierung des MHC-Komplexes auf der Zelloberfläche. DZ sind nun in der Lage von den lymphatischen Gefäßen zu den T-Zell-Arealen in den Lymphknoten zu wandern und dort enge Kluster mit T-Zellen zu bilden. Die Induktion der T-Zell Antwort wird durch die Sekretion von T-Zell spezifischen Chemokinen begünstigt. Die Ligation von CD40, welches auf aktivierten DZ exprimiert wird und CD40- Ligand auf T-Zellen führt zu einer Hochregulation von CD80 und CD86, sowie einer erhöhten Sekretion von IL-12, das sowohl von den meisten Pathogenen, als auch von T-Zellen über den CD40-Ligand sezerniert wird [36, 38]. Dies führt zur verstärkten Entwicklung von Th1-CD4+ T-Zellen und zur Ausreifung von zytotoxischen T-Zellen (CTL). Diese ausgeprägte immunstimulatorische Funktion dendritischer Zellen kann mit Hilfe einer autologen gemischten Lymphozytenreaktion demonstriert werden, da DZ sehr starke Stimulatoren allogener T-Zellen sind [36].

### **1.3. Das ADMA / DDAH-System**

#### **1.3.1 Das Endothel und seine Funktionen**

Trotz seiner nur mikroskopischen Dimension, mit einer Dicke von häufig weniger als 1µm stellt das Endothel eine lebende „Membran“ und ein multifunktionelles Organ dar, ohne das ein Blutfluss und ein funktionierender Kreislauf nicht möglich wären, dessen Dysfunktion aber einen kritischen Faktor für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen darstellt [39]. Neben seiner Aufgabe als physische Barriere zwischen Blut und Gewebe, spielt das Endothel eine zentrale Rolle bei hämostatischen Mechanismen [40]. Es ist ein komplexes Organ, das auf Reize aus seiner Umwelt reagiert und vasoaktive Substanzen, sowohl vasokonstriktorisches, als auch

vasodilative aktiviert. Diese vasoaktiven Substanzen beeinflussen den Gefäßtonus, die Gefäßstruktur und die Gefäßfunktionen, indem sie das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen, die Apoptose, die Plättchenaggregation, die Monozyten- und Leukozytenadhäsion und die Thrombose modifizieren. Um die normale Gefäßstruktur und die normalen Gefäßfunktionen aufrecht zu erhalten, müssen die Vasokonstriktoren, welche das Zellwachstum induzieren, mit den Vasodilatoren, die umgekehrt das Zellwachstum hemmen, im Gleichgewicht stehen. Eine Dysfunktion des Endothels unterbricht die physiologische Homöostase der vasoaktiven Substanzen und führt dadurch zu pathologischen Veränderungen der Gefäßstruktur und -funktion [41]. Das Endothel fungiert nicht nur als Sensor und Empfänger, sondern auch als Signalgeber durch die Bildung einer Reihe von biologisch aktiven Stoffen, wie Lipidmediatoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren, den Vasotonus modulierende Substanzen, wie Prostazyklin, NO, Endothelin-1 und Angiotensin II. Außerdem kann es noch weitere hormonähnliche Verbindungen freisetzen, die als wirksame Effektoren wirken und eine Vielzahl von Zellen und Geweben auf auto- und parakrinem Wege beeinflussen, wobei die Wirkung sowohl zu einer streng lokal begrenzten als auch zu einer systemischen Aktivierung des Endothels führen kann [39]. Angesichts seiner anatomischen Lage als Grenzschiicht, seiner integrativen Signalgeberfunktion, des umfangreichen Repertoires an biologisch aktiven Mediatoren, die durch das Endothel gebildet und freigesetzt werden können, spielt es eine entscheidende Rolle bei pathophysiologischen, die Gefäßwand betreffenden Prozessen. Das Endothel kann jeweils Agonist und Antagonist bilden, welches das dynamische Gleichgewicht zwischen beiden Gefäßfunktionen letztendlich bestimmt: Hämostase und Thrombose, Vasorelaxation und Vasokonstriktion, vaskuläres Wachstum und Remodelling, inflammatorische und immunmodulatorische Vorgänge [42]. In *Tabelle 1* sind die wichtigsten Agonisten und Antagonisten gegenüber gestellt [43]. Furchgott et al fanden heraus, dass Endothelzellen das freie Radikal Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO) herstellen, welches für eine intakte Endothelfunktion essentiell ist. Für schädigende Effekte exogener atherogene Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, verschiedene Formen von Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus, Rauchen, Altern und Hyperhomozysteinurie, ist das Endothel ein äußerst sensitives Ziel und das Endothel kann zur Folge dysfunktional werden mit einer abgeschwächten endothelabhängigen Vasodilatation [44]. Wegen seiner speziellen anatomischen Position stellt das



Endothel ein erstes Ziel für Krankheiten wie Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Schädigungen durch Rauchen und Ischämie dar [45].

### **Antithrombotisch**

#### **Prostazyklin**

Thrombomodulin  
Heparin-Proteoglykase  
Gewebeplasminogenaktivator  
Urokinase

### **Vasorelaxantien**

#### **Prostazyklin**

NO  
EDHF

### **Wachstumsinhibitoren**

#### **TGF- $\beta$**

Heparansulfate  
Thrombospondin  
NO

### **Prothrombotisch**

#### **Plättchenaktivierender Faktor**

Gewebefaktor  
Von Willebrand-Faktor  
Plasminogenaktivator-Inhibitor-1  
Andere Koagulationsfaktoren

### **Vasokonstriktoren**

#### **Endothelin-1**

Angiotensin II  
PDGF

### **Wachstumsfaktoren**

#### **bFGF**

VEGF  
IGFs  
PDGF

**Tabelle 1:** Agonisten und Antagonisten, die das dynamische Gleichgewicht der Gefäßfunktionen aufrechterhalten

### **1.3.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Botenstoff**

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von chemischen Substanzen und physiologischen Botenstoffen auf die glatte Muskulatur der Gefäße relaxierend und damit gefäßerweiternd wirken. So führen Acetylcholin und Bradykinin, welche an Rezeptoren in der Gefäßwand binden zur Verringerung des Gefäßtonus. Dieselbe Wirkung besitzen Nitrate und Nitroglycerin [46]. Furchgott und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die durch Acetylcholin vermittelte Vasodilatation von einem intakten Endothel abhängig ist. Ist das Endothel beschädigt, führt Acetylcholin zu keiner Gefäßerweiterung, sondern es wirkt über muskarinerge Rezeptoren direkt an den glatten Muskelzellen und vermittelt eine Vasokonstriktion [47]. Die Botenstoffe binden an Rezeptoren der Endothelzellen und veranlassen sie einen weiteren Signaltransmitter zu sezernieren, welcher in den glatten Muskelzellen eine Relaxation auslöst. Dieser Botenstoff wurde anfangs „Endothelium Derived Relaxing

Factor“ oder EDRF bezeichnet. Noch vor der exakten Identifizierung von EDRF zu Stickstoffmonoxid wusste man, dass Radikale wie Superoxide diesen Botenstoff sehr effektiv inaktivieren können [48]. Dabei wird aus NO und Superoxiden Peroxynitrit gebildet, welches eine zytotoxische Wirkung für Zellen besitzt.

### **1.3.2.1 Synthese von NO durch die NO-Synthasen**

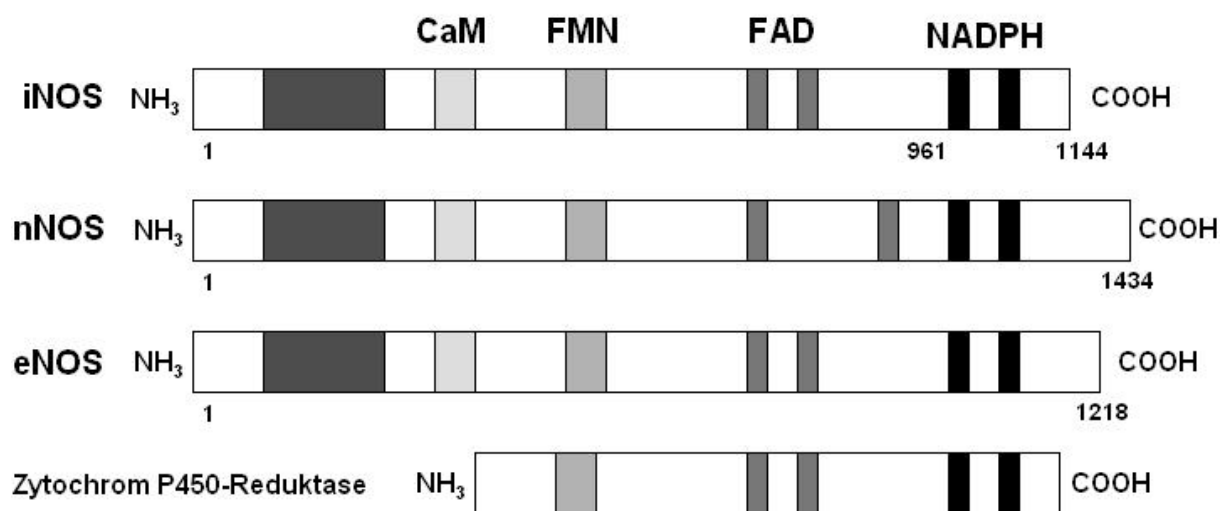
NO wird von Endothelzellen aus dem Guanidin-Nitrogen-Ende der Aminosäure L-Arginin durch eine komplexe Reaktion über das Enzym „Nitric Oxide Synthase“ (NO-Synthase, NOS) kontinuierlich gebildet. Es kann aber auch zusätzlich durch eine Vielzahl von physiologischen Stimuli, Scherkräfte des Blutes und pharmakologische Agenzien stimuliert werden [44, 47]. NO diffundiert als freies Gas sowohl in das Gefäßlumen als auch in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand [49]. In den Gefäßmuskelzellen stimuliert NO die Produktion seines „second messengers“ cGMP, das zu einem Abfall seiner intrazellulären Kalziumkonzentration und sukzessive zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führt. Die Hämeisengruppe ist für die Aktivierung der Guanylatcyclase durch NO von Bedeutung. Ohne sie besitzt NO nur eine schwache Wirkung auf die lösliche Guanylatcyclase. Obwohl es eine cGMP abhängige Komponente bei der NO-vermittelten Gefäß- Relaxation gibt, spielt die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase bei der NO induzierten Relaxation vermutlich eine größere Rolle [45].

### **1.3.2.2 Die NO-Synthase**

Die NO-Synthase ist ein Hämeisen -enthaltendes Enzym, welches die NADPH- und O<sub>2</sub>- abhängige Fünf-Elektronen Oxidation katalysiert, die letztendlich zur Freisetzung des potenten, endogenen Vasodilator NO führt [50]. Die NO-Synthase existiert in drei verschiedenen Isoformen benannt nach den Geweben, in welchen sie zuerst geklont und charakterisiert wurden:

1. NOS-I Isoform = neuronale NOS oder nNOS
2. NOS-II Isoform = induzierbare NOS oder iNOS
3. NOS-III Isoform = endotheliale NOS oder eNOS.

Sie sind alle Enzyme, welche die NADPH- und O<sub>2</sub> –abhängige Elektronen Oxidation von L-Arginin zu NO und Zitrullin katalysieren. Diese Enzyme besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu der NADPH-Zytochrom P- 450 Reduktase [51] und sie sind die einzigen Proteine, welche sowohl eine hydroxische Reaktion als auch eine NADPH Reduktion katalysieren können. Zwischen den einzelnen Spezies sind die drei Isoformen mit 85-95 % Sequenzhomologie hoch konserviert (Abb9). Untereinander zeigt sich jedoch nur eine 50-55 %ige Sequenzhomologie, in Domänen, welche Bindungsstellen für verschiedene Kofaktoren, wie Calmodulin und Flavinmononukleotide besitzen [52].



**Abbildung 9: Vergleich der drei NOS- Isoformen und der Cytochrom P450-Reduktase.** Die Abbildung zeigt die Proteinstruktur der NOS- Isoformen und der mit ihnen verwandten NADPH- Zytochrom P450-Reduktase. Gekennzeichnet sind die verschiedenen Bindungsstellen des Substrates L-Arginin und der Kofaktoren Calmodulin (CaM), Flavinmononukleotid (FMN), Flavin- Adenindinukleotid (FAD) und Nikotinamid-Adenindinukleotid- Phosphat (NADPH). Die Aminosäuresequenz der Isoenzyme weist eine 50-55%ige Homologie auf.

Die neuronale NOS spielt hauptsächlich im Gehirn und Nervensystem bei der Signaltransmission eine wichtige Rolle. Sowohl nNOS als auch eNOS werden von Endothelzellen und zahlreichen anderen Zellen konstitutiv gebildet, weshalb man sie

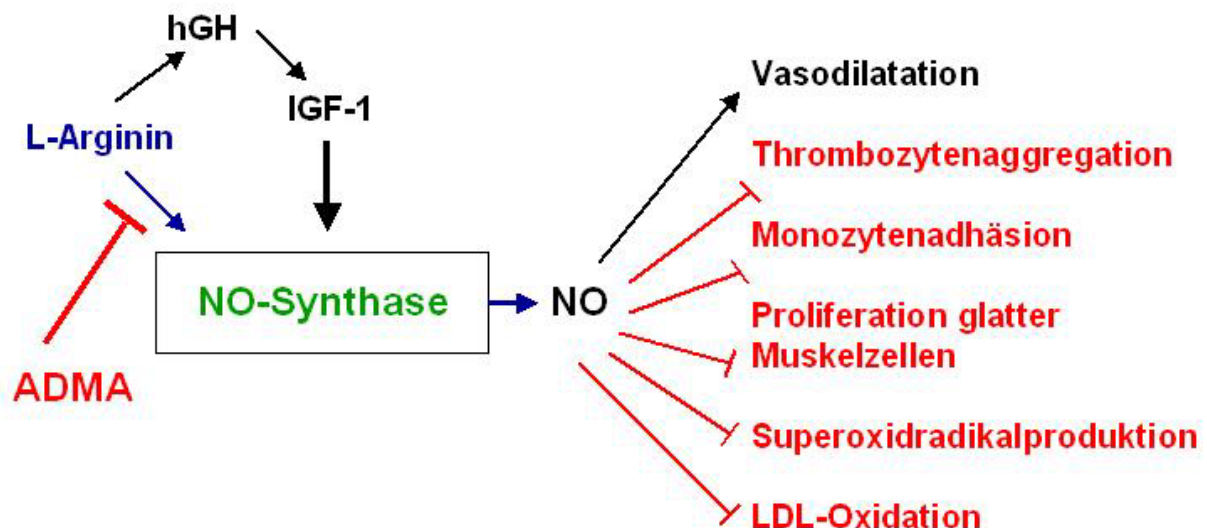
auch als cNOS bezeichnet. Sie sind beide Kalzium und Calmodulin abhängig, denn ihre Aktivität wird durch die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert [53]. Die iNOS wird bei einer Entzündungsreaktion von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und anderen betroffenen Zellen unter dem Einfluß von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , exprimiert. Es ist ein Kalzium unabhängiges Enzym und kann durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 $\beta$  oder INF- $\gamma$  induziert werden [54, 55]. Die Regulation von iNOS geschieht über die Enzymtranskription. Ist sie einmal vorhanden produziert iNOS weit mehr NO als eNOS und nNOS [55].

Die Expression und die Aktivität der endothelialen NO- Synthase und damit die NO Produktion, unterliegen einer fein gesteuerten Regulation. Scherkräfte durch den Blutfluss, die Verfügbarkeit des NO- Substrats L- Arginin, oder aber NOS Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin führen zur Modulation von Expression und Aktivität der NOS. Die Produktion von NO durch NOS kann durch L- Arginin- Analoga inhibiert werden und somit einen negativen Einfluss auf die Endothelfunktion haben [49]. Ursächlich für die Ausbildung einer Endotheldysfunktion ist, unabhängig von ihrer Ursache, ein Verlust an biologisch aktivem endothelialem NO, durch reduzierte Bildung von NO und gesteigerte oxidative Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffradikale

### 1.3.2.3 Vaskuloprotektive Wirkungen von NO

NO besitzt nur eine sehr kurze Halbwertszeit und diffundiert so als freies Gas durch Zellmembranen und andere Barrieren, um so mit einer Vielzahl von Proteinen zu reagieren. Es verbindet sich mit Thiolen zu sogenannten Nitrosothiolen, die eine Detoxifikation auslösen, da diese Thiole weniger reaktiv sind und weniger reaktive Sauerstoffverbindungen bilden [40]. Andererseits kann NO aber auch mit Superoxiden wie O<sub>2</sub> zu Peroxynitrit, einem hochreaktiven toxischem Anion, reagieren. Zerfällt Peroxynitrit, entsteht mit dem Hydroxylradikal, eine sehr stark oxidativ wirkende Verbindung, die zur Tötung von Mikroorganismen und zur Gewebeschädigung führt [56]. Neben der vasodilatorischen Wirkung blockiert NO in der Gefäßwand eine Reihe proatherosklerotischer Effekte (*Abb. 10a*). So unterbindet NO die Adhäsion und Infiltration von Leukozyten durch Inhibition der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen, die Proliferation glatter Muskelzellen und die Thrombozytenaggregation an die

Endothelschicht [57]. NO verhindert damit einerseits die Thrombusbildung und andererseits die Einlagerung von oxidiertem LDL und die damit verbundene Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen. NO ist ein endogenes anti-atherogenes Molekül, welches Schlüsselprozesse im Krankheitsverlauf der Atherosklerose verhindert, und somit ein sehr effektiver Vasodilator [58]. Es steht aktiv einer Vielzahl vasokonstriktorisches Einflüssen im gesunden Gefäßsystem entgegen und erhält einen vasodilatierenden Tonus aufrecht. Eine Vielzahl von Einflüssen, die als kardiovaskuläre Risikofaktoren bekannt sind, führen zur Verminderung der biologischen Aktivität [44]. Steht NO aufgrund erhöhter ADMA-Konzentrationen nicht mehr ausreichend zur Verfügung, setzt die vasodilatorische Wirkung von NO aus und die oben erwähnten anti-atherosklerotischen Effekte werden in ihrer Funktion gehemmt (Abb.10b).



**Abbildung 10: Bildung von NO aus der Aminosäure L- Arginin.** L- Arginin ist ein Stimulus für die Freisetzung des Wachstumshormons hGF, welches über seinen „second messenger“ „Insulin-like Growth Factor (IGF) die NO- Synthase induziert. ADMA führt zur Hemmung der NO- Synthase. Die Abbildung zeigt die Hemmung der anti-atherosklerotischen Effekte (in rot dargestellt) durch ADMA (nach Bode-Böger et al 1997, [59]).

### 1.3.3 ADMA - ein Risikofaktor für Atherosklerose

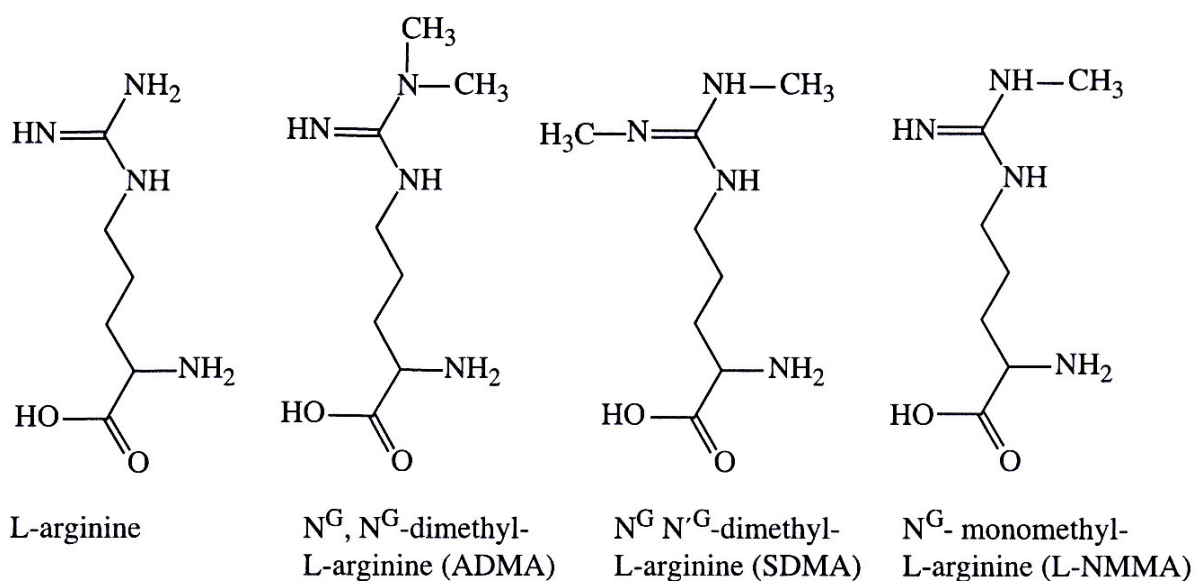
Vor fast 20 Jahren entdeckten und charakterisierten Vallance und Mitarbeiter ein Molekül namens ADMA als einen endogenen, kompetitiven Inhibitor der NO-

Synthase, das sowohl in humanem Blut, als auch im Urin nachgewiesen werden kann [60]. Als Analog der Aminosäure konkurriert es mit dieser um die NOS. Diese kompetitive Inhibition von NOS durch ADMA ist durch exogene Zugabe von L-Arginin reversibel [61]. In jungen hypercholesterolämischen Patienten assoziierte man die erhöhte ADMA- Konzentration mit einer verringerten endothelabhängigen Vasodilation [62]. Im Gegensatz zu gesunden Patienten, die eine ADMA- Konzentration von ungefähr 1µmol/l aufweisen [63], steigt diese in Patienten mit Risikofaktoren für vaskuläre Erkrankungen um das Zweifache an. Patienten mit klinischer Atherosklerose können Werte aufweisen, die bis um das zehnfache ansteigen. [58, 64]. Erhöhte ADMA- Konzentrationen korrelieren positiv mit Risikofaktoren für Atherosklerose [65], so dass ADMA neben anderen traditionellen Risikofaktoren und neuen Biomarkern zu endothelialer Dysfunktion, einem frühen Marker für koronare Herzerkrankungen und Atherosklerose, führt und somit ein unabhängiger Risikofaktor für diese Erkrankung ist [66]. Cooke und andere Autoren konnten eine Korrelation zwischen erhöhten Plasma- ADMA- Konzentrationen in Zusammenhang mit anderen Risikofaktoren wie Alter, Hypertonie, Diabetes mellitus, Insulinresistenz, Hypercholesterolämie, Hypertriglyzeridämie, Homocysteinämie und Atherosklerose zeigen. Der Beweis für eine Assoziation zwischen gesteigerten ADMA Werten und einer reduzierten NO- Synthese konnte ebenfalls erbracht werden [67-69]. Ferner korrelieren erhöhte ADMA- Konzentrationen mit Intima-Media Verdickung der Carotiden und kardiovaskulären Komplikationen, wie Schlaganfall, Herzversagen und peripheren arteriellen Erkrankungen [67]. In *Abb.11* sind einige Krankheiten gezeigt, bei denen erhöhte ADMA- Konzentrationen eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt.



**Abbildung 11: Klinische Auswirkungen, verbunden mit erhöhten ADMA-Konzentrationen.** (nach Böger et al. 2003 [70]).

Strukturell zeigt ADMA eine gewisse Homologie zu der Aminosäure L- Arginin und fungiert als Inhibitor der NO- Synthese (Abb.12). Im Gegensatz zu ADMA hat das strukturelle Isomer Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) keinen negativen Effekt auf die NO Produktion.

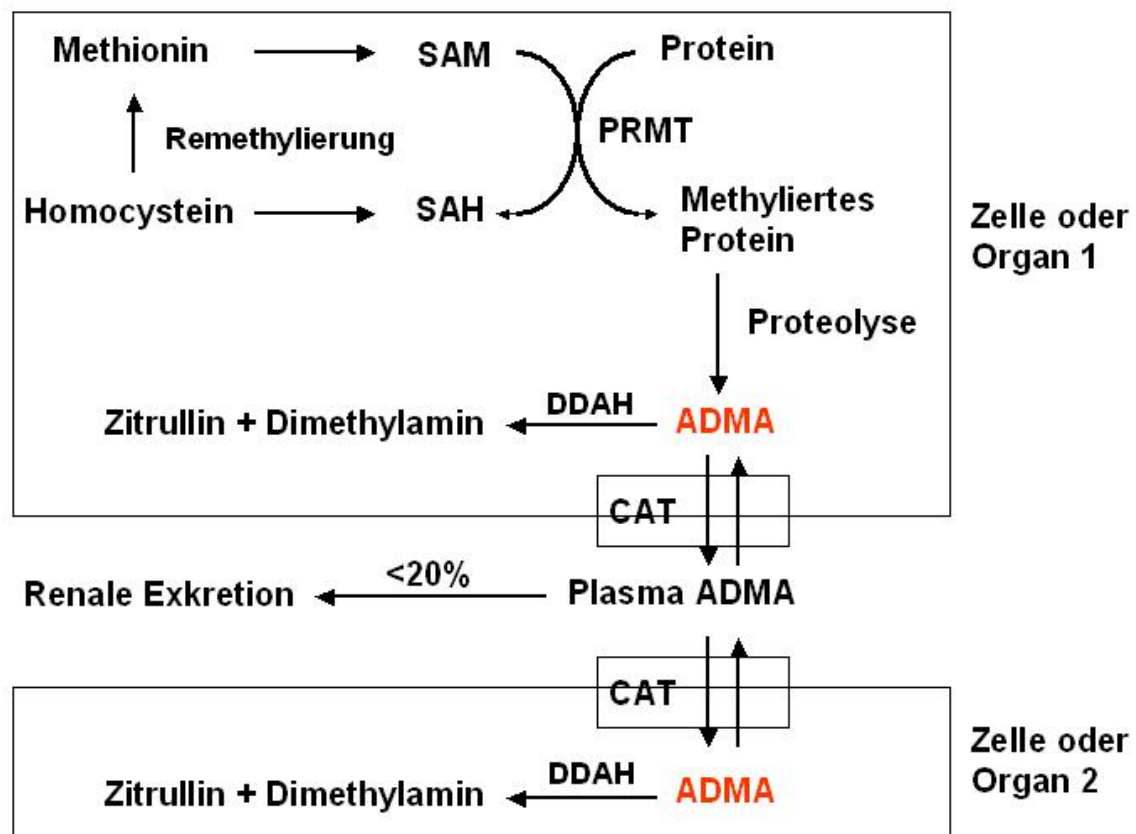


**Abbildung 12: Chemische Strukturformeln.** *L-Arginin als physiologisches Substrat der NO- Synthase, ADMA, SDMA und L-NMMA (nach Valkonen und Laaksonen, 2004, [71]).*

### 1.3.3.1 Bildung und Metabolismus von ADMA (Abb.13)

ADMA stammt nicht aus der Methylierung freien L- Arginins, sondern wird durch posttranslationale Modifikation von Argininresten, mit Hilfe von verschiedenen, spezifischen Proteinen, die im Zellkern zu finden sind, gebildet [72]. Die terminale Guanidingruppe von Arginin kann mit dem Enzym Protein Arginin Methyltransferase (PRMT), von dem es zwei Klassen gibt, dimethyliert werden. Typ1 PRMT katalysiert die Bildung von ADMA, während Typ2 PRMT zur Bildung von symmetrischem Dimethylarginin führt. Beide Typen der PRMT sind in Arginin- Glycin reichen Sequenzen von Proteinen zu finden [73]. Um Proteine zu methylieren verwenden sie S- Adenosylmethionin (SAM), welches aus Methionin und ATP synthetisiert wird, als Methylgruppen Donor. Nach dem Transfer seiner Methylgruppe, wird SAM in S- Adenosylhomozystein (SAH) umgewandelt. Die enzymatische Metabolisierung von SAH zu Homozystein ist reversibel und es steht wieder für eine Remethylierung zu Methionin zur Verfügung. Die letztendlich methylierten Proteine werden proteolytisch gespalten, wodurch freies ADMA und L- NMMA gebildet wird, welche im Zytosol mit dem Substrat L- Arginin konkurrieren und die NOS inhibieren [74]. Der größte Teil des freien ADMA wird durch das intrazelluläre Enzym DDAH im Zytosol derselben Zelle zu Zitrullin und Dimethylamin hydrolysiert [75]. Einem kleinen Anteil gelingt es der Degradierung durch DDHA zu entkommen und über ein Kationen Aminosäuren Transportsystem (CAT) aus der Zelle in den Blutstrom transportiert zu werden [76]. Eine kleine Fraktion des zirkulierenden ADMA wird renal über die Nieren ausgeschieden, die restlichen 80 % werden von anderen Zellen oder Organen aufgenommen und über DDAH hydrolytisch degradiert [73]. Die hydrolytische Inaktivierung von ADMA durch DDAH spielt eine wichtige Rolle bei der ADMA Regulation im Plasma, Serum und Gewebe [77].





**Abbildung 13: Schematischer Überblick über den Metabolismus von ADMA.** (nach Teerlink 2005, [73])

### 1.3.3.2 Das Enzym Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Die verschiedenen Enzyme der DDAH- Familie sind hauptsächlich zytosolische Enzyme, die während der Evolution hoch konserviert sind und ebenso in primitiven, als auch höheren Organismen identifiziert wurden. Im menschlichen Organismus gibt es zwei verschiedene Isoformen, welche von Genen codiert werden, die auf Chromosom 1 (DDAH-I) und Chromosom 6 (DDAH-II) lokalisiert sind. Die beiden Isoformen sind in unterschiedlichen Geweben zu finden, besitzen aber fast die gleiche Aktivität, [78, 79]. So dominiert DDAH-I im Gehirn und der Niere, welche nNOS und DDAH-2 im Herz, der Plazenta und auch der Niere, welche eNOS exprimieren [71]. DDAHs und NOS sind in vielen verschiedenen Zellen kolokalisiert, so dass die Regulation von ADMA vorwiegend in NO generierenden Zellen stattfindet [80]. Obwohl beide DDAHs verbreitet zu finden sind, so auch im kardiovaskulären

System, beschränken sie sich nicht nur auf NOS exprimierende Zellen und Gewebe [81].

Wie bereits erwähnt gibt es zwei Wege ADMA abzubauen. Zum einen durch renale Exkretion und zum anderen wird es mit dem Enzym DDAH metabolisiert. Erhöhte Plasma- ADMA- Konzentrationen, beispielsweise ausgelöst durch renale Erkrankungen, werden mit einer schweren endothelialen, vasodilatorischen Dysfunktion in Verbindung gebracht [71, 82]. Leiper und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die DDAH- Aktivität in zytosolischen Extrakten reversibel durch Zugabe von NO Aktivatoren inhibiert werden kann [83]. Man weiß heute, dass die DDAH- Aktivität ein wichtiger Mechanismus für die NOS- Kaskade ist, der zusätzlich durch kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflusst wird. Die Aktivität von DDAH wird durch oxidativen Stress beeinträchtigt und erlaubt ADMA weiter zu akkumulieren, die NO- Synthase zu blockieren und somit die Bioverfügbarkeit von NO zu reduzieren [84]. Eine große Bandbreite pathologischer Stimuli verursacht endothelialen oxidativen Stress, wie oxLDL, Cholesterin, inflammatorische Zytokine, Hyperhomozysteinämie, Hyperglykämie und infektiöse Agentien. Alle diese Faktoren vermindern die DDAH- Enzymaktivität, sowohl in vitro, als auch in vivo [72]. Das Enzym enthält vier Zystein Gruppen auf seiner Amniosaurenssequenz, welche von größter Bedeutung für seine Funktionalität sind. Die reaktiven Zysteinreste, mit ihren Sulfhydrylgruppen, auf der aktiven Seite des Enzyms, sind äußerst sensitiv für oxidativen Stress und mit spezifischen Inhibitoren leicht zu blocken [71, 82].

Um die Bedeutung von DDAH auf die NOS- Aktivität in vivo genauer zu untersuchen, kreierten und charakterisierten Cooke und Mitarbeiter eine transgene Maus für die humane Isoform DDAH-1 und untersuchten die Effekte der DDAH- Überexpression in Zellkulturen [72]. Sie stellten ein humanes DDAH-1 transgenes Konstrukt her und transferierten dieses in C57/BL76J Mäuse. Die Enzymaktivität dieser Tiere erhöhte sich bei gleichzeitiger Abnahme der Plasma- ADMA- Konzentration um 50 %. Die Reduktion des Plasma- ADMA ist mit einer signifikanten Erhöhung der NOS- Aktivität und NO-Produktion verbunden. Außerdem zeigten die Mäuse einen deutlich reduzierten systolischen Blutdruck. Mit diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass eine Beeinträchtigung der DDAH- Aktivität signifikante Effekte auf die vaskuläre Struktur, NO- Synthese und kardiovaskuläre Physiologie besitzt [85].

### 1.4 Ziele der Studie

Wie oben ausführlich beschrieben ist die Atherosklerose eine chronische, inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand, welche durch eine Endotheldysfunktion beeinflusst wird.

Ausgehend von der Hypothese, dass DZ entscheidend an der vaskulären Inflammation/Immunantwort beteiligt und deshalb für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen relevant sind, sollte die Bedeutung von ADMA bzw. DDAH für die Aktivierung der DZ und der subsequenten T-Zellstimulation charakterisiert werden. Basierend auf der verstärkten vaskulären Invasion und Transmigration der DZ durch ADMA war es von Interesse, ob DZ in der Lage sind ADMA eigenständig zu synthetisieren und in wie weit es deren Phagozytose-Aktivität und Reifeprozess beeinflusst. Es erfolgten weitere mechanistische Untersuchungen zur Charakterisierung der Relevanz des NO-Systems (iNOS) in humanen DZ, sowohl in Bezug auf ihren Reifegrad/ Aktivationsstatus, als auch in Hinblick auf die Aktivierung autologer T-Lymphozyten. Abschließend sollte in funktionellen in vitro Experimenten bestimmt werden, ob die durch DDAH verminderte ADMA- Aktivität tatsächlich die Aktivierung von DZ vermindern kann. Diese Untersuchungen wurden mittels DDAH-1 überexprimierender DZ aus DDAH-1 transgenen Mäusen durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

##### 2.1.1.1 Humane Zelllinien

HDZ: humane dendritische Zellen, isoliert aus heparinisiertem Vollblut

PBMZ: humane PBMZ, isoliert aus heparinisiertem Vollblut

##### 2.1.1.2 Murine Zellen

Murine aortale Endothelzellen aus dem Mausstamm C57/BL6 (ATCC über LGC Promochem Wesel; CRL-2279).

BmDZ: DDAH-1 transgene C57/BL6 Mäuse

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen

##### *iNOS:*

vorwärts: 5`ATTCACCTCAGCTGTGCATCG 3` Länge: 20 b Position: 1119

rückwärts: 5`CACAAGGTCAGGTGGGATTT 3` Länge: 20b Position: 1242

Annealingtemperatur: 57°C Produktlänge: 124bp

##### *GAPDH:*

vorwärts: 5` CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT 3` Länge: 24b Position

rückwärts: 5` AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC 3` Länge: 24b Position

Annealingtemperatur: 60°C Produktlänge: 500 bp

### 2.1.3 Antiseren

#### 2.1.3.1 Primäre Antikörper

##### 2.1.3.1.1 Für Westernblot

Purified Mouse anti – iNOS/NOS Type II Mab, 250 µg/ml	1:200, BD Transduction Laboratories (610328)
---	--

NOS2 (C-11), Mouse monoclonal IgG1	200 µg/ml	1:200, Santa Cruz
------------------------------------	-----------	-------------------

Actin (C-11), Goat polyclonal IgG	200 µg/ml	1:500, Santa Cruz
-----------------------------------	-----------	-------------------

Mouse Macrophage + INF $\gamma$ /LPS	1 mg/ml	BD Transduction
--------------------------------------	---------	-----------------

##### 2.1.3.1.2 Für FACS- Analyse humaner Zellen

IgG2a FITC/IgG1PE Fast Immune Control  $\gamma$ 2a FITC/ $\gamma$ 1PE, 50 Tests, BD (340458)

CD1a PE	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555807)
---------	---

CD1c FITC	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555806)
-----------	---

CD1c PE	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555807)
---------	---

CD3 PE	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (345765)
--------	---

CD4 FITC	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555347)
----------	---

CD11a/LFA-1 FITC	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555383)
------------------	---

CD11c PE	Mouse-anti human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (347637)
----------	---

CD14 FITC	Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (345784)
-----------	---

CD20 FITC Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD (345792)

CD54 PE Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (555511)

CD80 PE Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, Pharmingen (557227)

CD83 FITC FITC anti-human CD83, 100 Tests, Biozol (305306)

CD86 PE Mouse anti-human CD86 (B7-2), 100 Tests, Biozol (9791-09)

CD123 FITC human, 1 ml, Miltenyi Biotec (130-090-897)

CD 209 PE Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (551265)

CD209 FITC Mouse anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (551264)

BDCA-1 FITC CD1c (anti-BDCA-1) - FITC, human, 1 ml, Miltenyi Biotec (130-090-507)

BDCA-2 FITC Anti BDCA-2-FITC, human, 1 ml, Miltenyi Biotec (130-090-510)

Dec 205 FITC Mouse anti-human CD205 FITC, 0.1 mg, Biozol (BZL05649)

Mannose Rezeptor Mouse monoclonal antibody (Biotin), 0.1 mg/ml, Abcam (Ab8919)

HLA-DR PE Anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (347401)

HLA-DR-FITC Anti-human monoclonal antibody, 100 Tests, BD Pharmingen (347400)

CD36 Mouse anti-human monoclonal antibody, 0.1 mg/ml, Abcam (FA6-152)

LOX-1 Anti-human LOX-1/SR-E1 polyclonal antibody, 100 µg R&D Systems (AF1798)

### 2.1.3.1.3 Für FACS- Analyse muriner Zellen

CD34 PE

(MEC 14.7)              Rat monoclonal antibody, Santa Cruz (sc-18917)

Rat IgG2a FITC        Isotypkontrolle, 0.5 ml, BD Pharmingen (553929)

Rat IgG2a PE        Isotypkontrolle, 0.5 ml, BD Pharmingen (553930)

CD86 PE              anti mouse (B7-2), GL1, 1.0 ml BD Pharmingen (553692)

CD80 PE              anti mouse (B7-1), 16-10A1, 1.0 ml BD Pharmingen (553769)

CD40 FITC            anti mouse (3/23), 1.0 ml BD Pharmingen (553790)

CD54 FITC            anti mouse (ICAM-1), 3E2, 1.0 ml BD Pharmingen (553252)

CD11c PE            anti mouse, 1.0 ml Miltenyi Biotec (120002110)

MHC II Biotin        anti mouse, Biotin H-2D<sup>b</sup>, 1.0 ml BD Pharmingen (553601)

### 2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

#### 2.1.3.2.1 Für Westernblot:

Immuno Pure Antibody, Goat anti mouse IgG (H + L) 2.0 ml 1:1000,      Pierce-Perbio  
(31430)

Goat anti-Mouse IgG (H+L)

Anti-Mouse IgG-HRP	200 µg/0.5 ml 1:1000, Santa Cruz
Anti-Goat IgG-HRP	200 µg/0.5 ml 1:1000, Santa Cruz

### 2.1.3.2.2 Für FACS- Analyse humaner Zellen

Anti-Biotin PE 1 ml (1:11), Miltenyi	Biotec (130-090-756)
Anti-goat IgG PE, Porcine anti-goat (H+L) (F0106)	100 Tests, R&D Systems

### 2.1.3.2.3 Für FACS- Analyse muriner Zellen

Anti-Biotin PE 1 ml (1:11), Miltenyi	Biotec (130-090-756)
--------------------------------------	----------------------

### 2.1.3.3 Molekulargewichtsmarker

Multi Mark Multi-Colored Standard	Invitrogen (LC5725)
100 bp DNA-Ladder	500 µg/ml Bio Labs (N3231L)

### 2.1.4 Nährmedien und Zusätze für Zellkultur

VLE RPMI 1640 Medium (1x)	500 ml, Biochrom (F1415)
PBS Dulbecco (1x)	500 ml, Biochrom (L1825)
HBSS	500 ml, Gibco (14025- 050)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml, Gibco (21063- 029)
L-Glutamine 200 mM	100 ml, Gibco, Invitrogen
Fetal Bovine Serum	500 ml, Sigma (F7524)
Trypsin – EDTA-Solution	0.05 %/0.02 % (w/v) in PBS w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , Biochrom (L2143)



0.1 % Gelatine	100 g from porcine skin, type A (G1890)
Trypan Blue 0.05 % (L6323)	100 ml, Biochrom AG

### 2.1.5 Antibiotika und Zytokine

Penecillin/Streptomycin	10000 U oder 10000 µg/ ml, Biochrom AG (A 2210)
Human IL-4 (10 µg)	20 ng/ml, Tebu-Bio (200-04)
Human GM-CSF (10 µg)	20 ng/ml, Tebu-Bio (300-03)
Human IL-1β (10 µg)	20 ng/ml, Tebu-Bio (20001B)
Murine GM-CSF (10 µg)	20 ng/ml, Tebu-Bio (315-03)
Flebogamma 5 %	50 mg Protein/ml, IgG = 97 %, 1:3 mit PBS verdünnen, Grifols

### 2.1.6 Stimulantien für Zellkultur

TNF-α	10 µg, Sigma (T6674)
LPS	1 mg/ml, Sigma (L9764)
DMNQ	10 mg/10 ml DMSO, Sigma (D5439)
Mannan	2 mg/2 ml, Sigma (M7504)
pCMBS	100 mg, Toronto Research (C367750)
N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl - L-Arginine Hydrochloride	10 mg, Sigma (D0390)

Cell Tracker Green CMFDA

Molecular Probes über  
MoBiTech, Göttingen (C-  
2927)

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

#### 2.1.7.1 Puffer für analytische und präparative Auftrennung von DNA

50 x TAE Puffer

242 g Tris-Base (2M)  
57 ml 100 % Essigsäure  
100 ml 0,5 M EDTA (50  
mM), pH8  
H<sub>2</sub>O auf 1000 ml

Auftragspuffer

#### 2.1.7.2 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

NuPAGE SDS Runnigbuffer 20x

500 ml, Invitrogen  
(NP0001)

NuPAGE Transfer Buffer 20x

125 ml, Invitrogen  
(NP0006)

NuPAGE Tricine SDS Sample Buffer

2x20 ml, Invitrogen (LC  
1676)

Ponceau S Staining Solution

1 l, Sigma (P7170)

Restore Westernblot Stripping Buffer

500 ml, Pierce (21059)

NuPAGE Sample Reducing Agent

10 ml, Invitrogen  
(NP0009)

NuPAGE Antioxidant

15 ml, Invitrogen  
(NP0005)

Blotpuffer (Transferpuffer) 13 ml NuPAGE Transfer  
Antioxidant, 10 % (ein Gel), 20 % (zwei Gele)

Stock 20x250 µl  
Methanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Waschpuffer

5 % Magermilchpulver +  
0.05 % Tween 20

### 2.1.7.3 Puffer für die Fluoreszenzfärbung

FACS Puffer (humane Zellen)	0.5 % BSA + 0.1 % NaN <sub>3</sub> auf 500 ml PBS
FACS Puffer (murine Zellen)	0.1 % BSA + 0.02 % NaN <sub>3</sub> auf 500 ml PBS

### 2.1.8 Lösungen für die Proteinlyse und Proteinbestimmung

M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent	250 ml Pierce (78501)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets 25 Tabletten, 1 Tablette/10 ml M-PER, Roche	
RIPA Buffer	100 ml, Pierce (89900)
Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit	Pierce (78410)
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A	1000 ml, Pierce (23223)
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Reagent B	25 ml, Pierce (1859078)
Albumin Standard	1 ml, Pierce (23209)

### 2.1.9 Chemikalien

Ficoll-Paque <sup>TM</sup> Plus	100 ml Amersham Biosciences
Agarose Electrophoresis Grade	500 g Invitrogen (15510- 027)
NuPAGE Novex Bis-Tris Gels 4-12 %	10/Box, Invitrogen (P0321)
Lucifer Yellow CH, Potassium Salz	25 mg, Molecular Probes (L1177)
Fluorescein isothiocyante-dextran	25 mg, Sigma (074K1295)

5-Sulfosalicylic acid Dihydrate	100 mg/ml, Sigma (S2130)
Monolaurate (Tween 20)	100 ml, Sigma (P7949)
Phenylmethanesulfonyl fluoride	200 mM, Sigma (P7626)
Cell proliferation Reagent WST-1	25 ml, Roche
Orange G Sodium Salt	25 g, Sigma (O-1625)
Tris 99.9 % p.a.	1 kg, Roth
Vectashield (Propidiumiodid)	10 ml, Vector (H-1300)
Vectashield (DAPI)	10 ml, Vector (H-1200)
EDTA	

### 2.1.10 Kits

ADMA-ELISA	DLD Diagnostika GmbH (EA201/96)
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit	Pierce (34082)
Rneasy Mini Kit	QIAGEN (74104)
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	QIAGEN (205111)

### 2.1.11 Geräte

BDK Laminar Air flow Werkbank	
Liebherr Kühlschrank	
Liebherr Premium Gefrierschrank	
FACScan, Becton Dickinson	
Tecan Genios Fluoreszenzreader, Photometer, Chemilumineszenzreader Komiggerät	
Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems	
Lauda Wasserbad mit Badgefäß und Einhängthermostat	
Hettich Zentrifuge, Mikro 22R	
Hettich Zentrifuge, Rotina 46R	
Eppendorf Centrifuge 5804, mit Ausschwingrotor	
Kendro HFU 586 Top -80°C Kühlschrank	

Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700  
Schüttler GFL 3006  
Feinwaage Sartorius Basic  
Eppendorf Bio Photometer  
Eppendorf Therometer Compact  
Bio Rad Power PAC 200  
X Cell Sure Lock™ Electrophoresis Cell, Invitrogen  
X Cell II™ Blot Module  
Magnetrührer IKAMAG RH  
Vortex, Heidolph REAX top  
Nalge Nunc Inkubator  
Mikroplattenschüttler Mini Rocker MR-1  
Rollmischer MR-5  
Rotator für 1.5 ml Reaktionsgefäße RT 20 CAT  
Messer Stickstofftank ADUR ß  
Curix 60 Entwicklungsmaschine, AGFA

### **2.1.12 Wichtige Verbrauchsmaterialien**

Falcon 50 ml Röhrchen (352070)  
Falcon 15 ml Röhrchen (352096)  
Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen (352063)  
Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol (352052)  
Falcon Petrischalen (351029)  
Falcon T25 Zellkulturflaschen (353108)  
Falcon T75 Zellkulturflaschen (353136)  
Falcon transparente 96-well Zellkulturplatte (353072)  
BD Plastipak Perfusion syringe 50 ml (300137)  
Nunc Cryo Tube vials (03242)  
Corning Costar weisse 96-well Platten (3917)  
Corning 5 ml Stripette (4487)  
Corning 10 ml Stripette (4488)  
Eppendorf Combitips plus 2.5 ml  
Eppendorf Combitips plus 5 ml

Sarstedt Zellschaber 25 cm (83.1830)

Sarstedt 1.5 ml Reaktionsgefäße (72.690)

Sartorius Minisart Plus Spritzenaufsatzfilter 0.2µm (17823)

Zeiss Axiovert 25 Fluoreszenzmikroskop

Nitrocellulose Membran, 20/PK, Invitrogen (LC2001)

CL-XPosure Films, (12-5x17.5 cm), Perbio Science Deutschland GmbH

## 2.2 Methoden

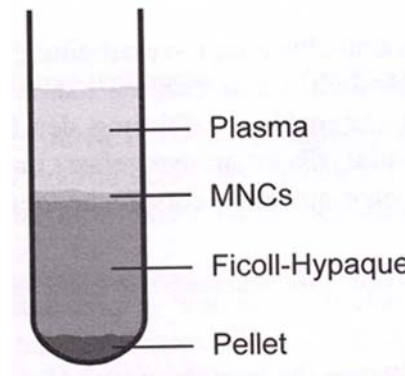
### 2.2.1 Methoden in der Zellkultur

#### 2.2.1.1 Aufreinigung von PBMZ aus heparinisiertem Vollblut und Kultivierung von humanen dendritischen Zellen (hDZ)

100 ml heparinisiertes Vollblut (0.5 IE Natrium- Heparin/ml Blut) wird mit 100 ml unkomplettiertem RPMI Medium verdünnt und im Verhältnis 3:1 langsam und vorsichtig, in 50 ml Röhrchen auf Ficoll überschichtet [86]. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgt für 25 min bei 560 g ohne Bremse. Der Überstand über der gewünschten Zellfraktion wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die milchig weiß erscheinenden „Zellringe“ der einzelnen Röhrchen (*Abb.14*), in denen sich die weißen Blutzellen befinden, überführt man sorgfältig in ein neues Röhrchen im Verhältnis 1:1 und füllt es mit unkomplettiertem RPMI Medium bis 50 ml auf. Anschließend erfolgt der zweite Zentrifugationsschritt für 10 min bei 1800 rpm. Der Überstand wird abdekantiert und das Zellpellet mit je 5 ml unkomplettiertem Medium in 15 ml Röhrchen überführt, mit weiteren 5 ml Medium aufgefüllt und zweimal für 5 min bei 1500 rpm gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in ausreichend komplettiertem Medium (RPMI + 10 % „very low endotoxin“ FCS, 2 ml L-Glutamin und 10000 U Penicillin/Streptomycin) vorsichtig resuspendiert.

Während dieser Aufreinigung werden parallel Petrischalen mit 2 ml eines Gemisches aus Gammaglobulinen (Flebogamma 5 %) und PBS im Verhältnis 1:3 für 30 min bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend werden die Schalen trocken abgesaugt und  $5-7 \times 10^5$  Zellen/ml und /Platte ausgesät. Nach zweistündiger Adhärenzzeit der Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wird der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen wieder entfernt, die Schalen 2-3 x mit 2 ml Komplettmedium vorsichtig gewaschen und jeweils 3 ml Stimulanzmedium, beinhaltend Komplettmedium und Zytokine (20 ng hGM-CSF, 20 ng IL-4), aufgetragen. Nach drei Tagen entfernt man 700 µl Medium von den Schalen und ersetzt dieses durch 1 ml frisches Stimulanzmedium,

lässt die Zellen für weitere 2-3 Tage inkubieren, bevor sie für Versuche verwendet werden.

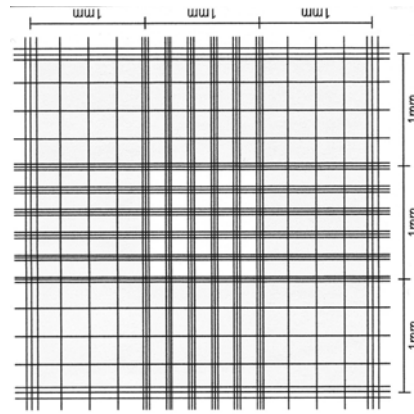


**Abbildung 14: Aufreinigung von PBMZ über einen Ficoll- Gradienten.** Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Blutzellen können durch einen Ficoll- Gradienten mononukleäre Zellen durch anschließende Zentrifugation separiert werden. Nach weiteren Waschschritten, bei denen restliche Erythrozyten und Thrombozyten entfernt werden, können Monozyten und Makrophagen über die Adhäsion an Gammaglobulin beschichtete Platten aus den mononukleären Zellen aufgereinigt werden. Durch die Zugabe der Zytokine GM-CSF und IL-4 können aus den Monozyten und Makrophagen myeloide DZ generiert werden.

### 2.2.1.2 Zellzählung mit Trypanblau

25µl Zellsuspension werden mit 25 µl Trypanblau gut vermischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 10 µl der Suspension auf die Neubauer Zählkammer (Abb.15) aufgetragen und die vier äußeren Felder jeweils auf blaue („tote“) und weiße (lebende) Zellen ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop blau, da das Trypanblau aufgrund der Dysintegrität der Membran in die Zellen einströmt. Die ist bei intakten Zellen nicht möglich, weshalb sie weiß leuchten. Um die tatsächliche Zellzahl pro ml zu erhalten, multipliziert man den Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor (Trypanblau) und dem Kammervolumen (Fläche x Höhe) von 10000.





**Abbildung 15: Die Neubauer Zählkammer**

### 2.2.1.3 Zellen aussäen und stimulieren

Grundsätzlich werden alle Zellen in die folgenden Zellkulturschalen (Tabelle 2) mit einer vorher bestimmten Zellzahl und in dem für sie geeigneten Medium ausgesät und je nach Versuch mit den unterschiedlichen Substanzen stimuliert. Die folgende Tabelle dient der Veranschaulichung der Größe der Zellkulturschalen, Wachstumsfläche und Zellzahl/Vertiefung.

Zellkultur- Utensilien		Wachstumsfläche (cm <sup>2</sup> )	Zellzahl/ Vertiefung
Napf- Zellkulturschalen	96- Napf	0.32 – 0.6	$4\text{-}5 \times 10^4$
	48- Napf	1	$1.3 \times 10^5$
	24- Napf	2	$2.5 \times 10^5$
	12- Napf	4	$5 \times 10^5$
	6- Napf	9,5	$1.2 \times 10^6$
Petrischalen	ø 35 mm	8	$1 \times 10^6$
Zellkulturflaschen	40-550 ml	25	$3.1 \times 10^6$
	250-300 ml	75	$9.4 \times 10^6$

**Tabelle 2:** Übersicht der verschieden großen Zellkulturschalen mit Wachstumsfläche und Zellzahl.

### **2.2.1.4 FCS Hitze inaktivieren**

Das für die Zellkultur verwendete FCS muss vor seinem Einsatz mit Hitze behandelt werden, um mögliche Komplementfaktoren zu inaktivieren. Dazu wird das FCS 30 min bei 56°C inkubiert und anschließend in 50 ml Aliquots bei -20°C für den weiteren Gebrauch aufbewahrt.

### **2.2.1.5 Kultivierung und Passage muriner Endothelzellen**

Die murine Endothelzelllinie (mEZ) aus dem Mausstamm C57/BL6 ist ein durch SV40 Transformierung immortalisierter Endothelzellklon aus Langerhans- Inseln der Bauchspeicheldrüse und wurde auf die Aufnahme von acetyliertem LDL und Expression des von Willebrand Faktors und des VEGF Rezeptors überprüft.

Murine Endothelzellen (mEZ) werden in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS (Vollmedium) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und bis maximal zur zwanzigsten Passage für die Versuche verwendet. Die Zellen werden dreimal pro Woche mit frischem Medium versorgt und mindestens einmal pro Woche passagiert, indem sie 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin- EDTA bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> abtrypsinisiert werden. Dieser Vorgang wird nach ungefähr 10 min mit der Zugabe von frischem Medium gestoppt und die Zellen 15 min bei 1500 U abzentrifugiert. Das in neuem Medium aufgenommene Zellpellet wird im Verhältnis 1:5 auf frische Flaschen ausgesät.

### **2.2.1.6 Präparation von murinen Knochenmarkszellen und Kultivierung von dendritischen Zellen (BMDZ)**

Herstellung Transgener Mäuse

Um die transgene Linie zu kreieren wurden C57BL/6J Mäuse aus dem JacksonLabor, Bar Harbour, verwendet. Die dazu verwendeten Protokolle wurden zuvor von der „ Administrative Panel on Laboratory Animal Care of Stanford University geprüft und genehmigt. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen in einem 12 Stunden, hell/dunkel Rhythmus gehalten. Das humane DDAH-1 transgene Expressions-Konstrukt aus humaner DDAH-1 cDNA injizierte man in befruchtete Eier, welche zuvor der Maus entnommen wurden. Die Embryos wurden in das

Ovidukt einer pseudo-trächtigen B6CBAF1-Maus transferiert. Die genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien 3-4 Wochen alter Mäuse mittels herkömmlicher Methoden isoliert (55, [85]).

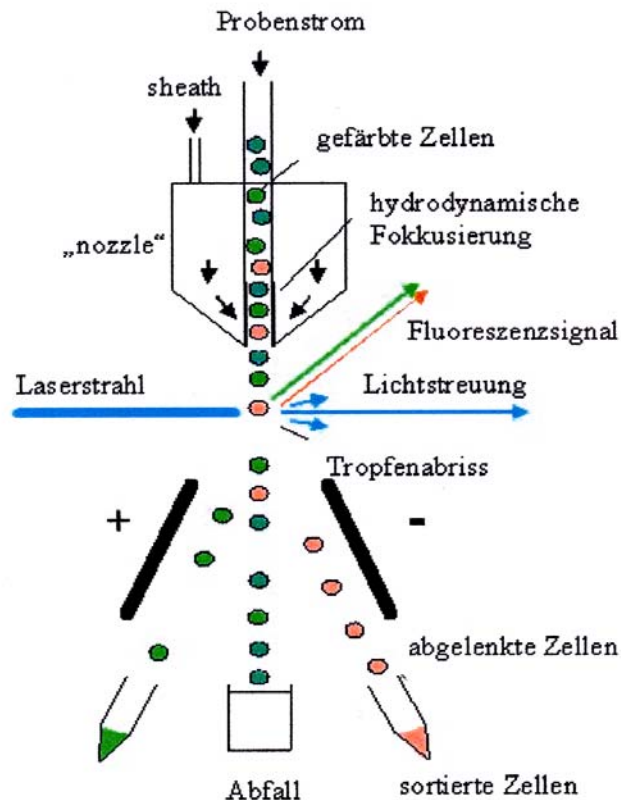
Die Methode Knochenmarkszellen aus Mäusen zu isolieren wird von Lutz und Kollegen [87] [88] übernommen und z.T. modifiziert.

Zunächst trennt man die Hinterbeine von 3-6 Monate alten weiblichen C57/BL6 Mäusen vom restlichen Körper und legt Femur und Tibia frei. Die Knochen werden sorgfältig von Gewebe und Muskeln befreit. Die fertig sezierten Knochen werden für 5 min in 70 % igem Ethanol gebadet und weitere 4x in PBS kurz gewaschen. Die Enden der Knochen schneidet man mit einem Skalpell vorsichtig ab, spült die Femur und Tibia mit einer feinen Nadel (0.45 µm) mehrmals mit PBS durch, um das gesamte Knochenmark in einer mit 10 ml PBS gefüllten Petrischale aufzufangen. Dort resuspendiert man die Zellen vorsichtig mit einer 1 ml Pipette und überführt die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen, ohne dabei größere Gewebestücke mitzuführen. Die Zellen werden 10 min mit 1500 rpm zentrifugiert und noch zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Pro Knochen erhält man eine ungefähre Ausbeute von  $1 \times 10^7$  Leukozyten.  $2 \times 10^6$  Knochenmarkszellen werden auf 0.1 % Gelatine beschichtete Petrischalen für 24 h in Vollmedium (RPMI 1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 10000 U/ml Penicilin/Streptomycin) ausgesät und am folgenden Tag in neue Kulturschalen mit 10 ml Vollmedium + 200 U/ml mGM-CSF, umgesetzt. Für die Differenzierung muriner Knochenmarkszellen zu murinen DZ fungiert mGM-CSF als wesentlicher Wachstumsfaktor, während man bei der Kultivierung humaner DZ sowohl GM-CSF als auch IL-4 als essentielle Wachstumsfaktoren benötigt [89]. Nach drei Tagen füttert man die Zellen mit weiteren 10ml Vollmedium und 400 U/ml mGM-CSF. An Tag 6 wird der Überstand samt Zellen abgenommen, für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 10 ml frischem Vollmedium mit 200 U/ml mGM-CSF resuspendiert, aber auf dieselben Platten zurück pipettiert. Die gleiche Prozedur findet an Tag 8 statt. Nach 10 Tagen Kultivierung erhält man nicht adhärente, immature DZ, welche für die folgenden Versuche verwendet werden.

### **2.2.1.7 Durchflusszytometrie = Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Die FACS- Analyse ist ein Verfahren, welches in der Biologie und Medizin häufig zur Anwendung kommt. Der Name ist eigentlich irreführend, da meist keine Sortierung der Zellen vorgenommen wird, sondern eher eine Messung der Eigenschaften von Zellen, weshalb die richtige Bezeichnung des Verfahrens Durchflusszytometrie lautet. Diese Untersuchung erlaubt einerseits eine Unterteilung der Zellen nach Größe und Granulität und andererseits die Detektion der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen, sofern diese an einen fluoreszenz- gekoppelten Farbstoff gebunden sind. Aufgrund der veränderten Präsentation der Oberflächenmoleküle während der Entwicklung aus Monozyten/Makrophagen zu immaturen DZ stehen zur Charakterisierung DZ folgende Marker zur Auswahl. Im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen sind DZ CD14 negativ. Andererseits werden auf immature DZ CD11c, HLA-DR, DC-SIGN hochreguliert. Gleichzeitig sind sie positiv für den Myeloiden- Marker BDCA-1 und CD80. CD83 und CD86 werden erst von murenen DZ verstärkt exprimiert.

Das Prinzip der FACS- Analyse beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert (*Abb.16*). In einer Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht, aber auch Fluoreszenzimpulse, sofern entsprechend markierte Antikörper gebunden haben, wodurch man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann.



**Abbildung 16: Emission von optischen Signalen.** Ein laminarer Probenstrom von Zellen wird durch eine Kapillare gesaugt und passiert auf seinem Weg einen Laserstrahl, der die einzelnen Zellen anhand des emittierten Streulichts und Fluoreszenzimpulse in verschiedene Fraktionen aufteilt.

Das Streulicht wird durch verschiedene Faktoren, wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran, aber auch intrazelluläre Bestandteile (Granulität) beeinflusst (Abb. 17). Somit können die Zellen mit mehreren Parametern in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Die durchflusszytometrischen Daten können unterschiedlich dargestellt werden:

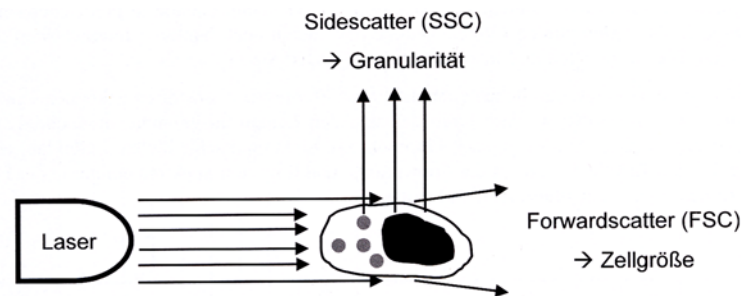
**Histogramm- Plot** mit linearer oder logarithmischer Skalierung der x- Achse: Einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird.

**Dot- Plot oder Punktwolkendiagramme** zeigen die Beziehung zweier verschiedener Fluoreszenzen auf einer Zelle.

**Dichteplot:** Überlagerte Punkte innerhalb eines Dot- Plots können im Dichteplot verschiedenfarbig sichtbar gemacht werden.

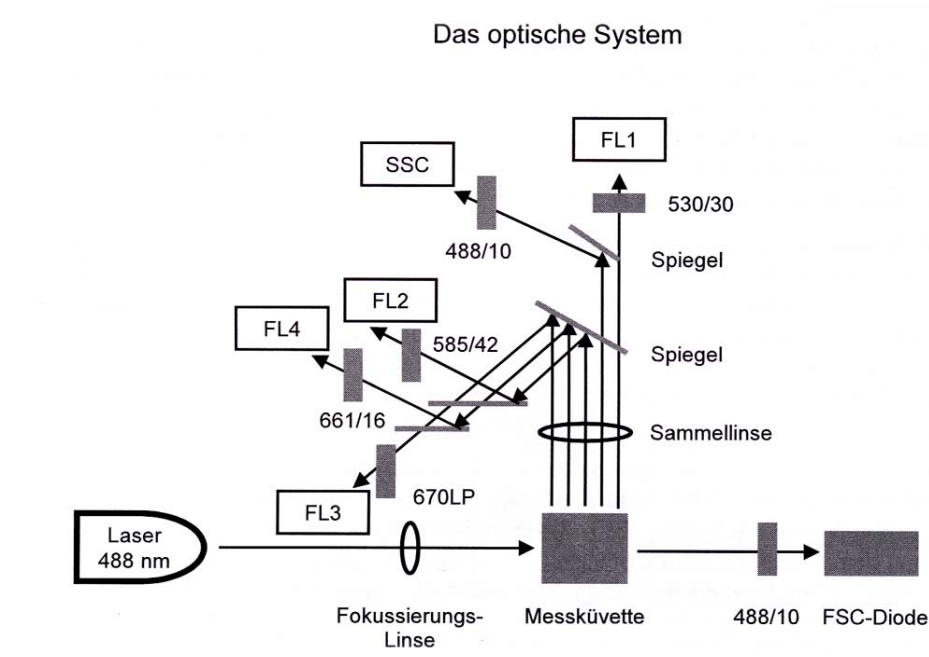
**Konturplot:** Punkte gleicher Dichte werden zusammengefasst, so dass Gebiete mit gleicher Dichte erkennbar werden.

**Isometrische Darstellung:** Darstellung der Ergebnisse eines Dot- oder Dichteplots in einer dritten Ebene.



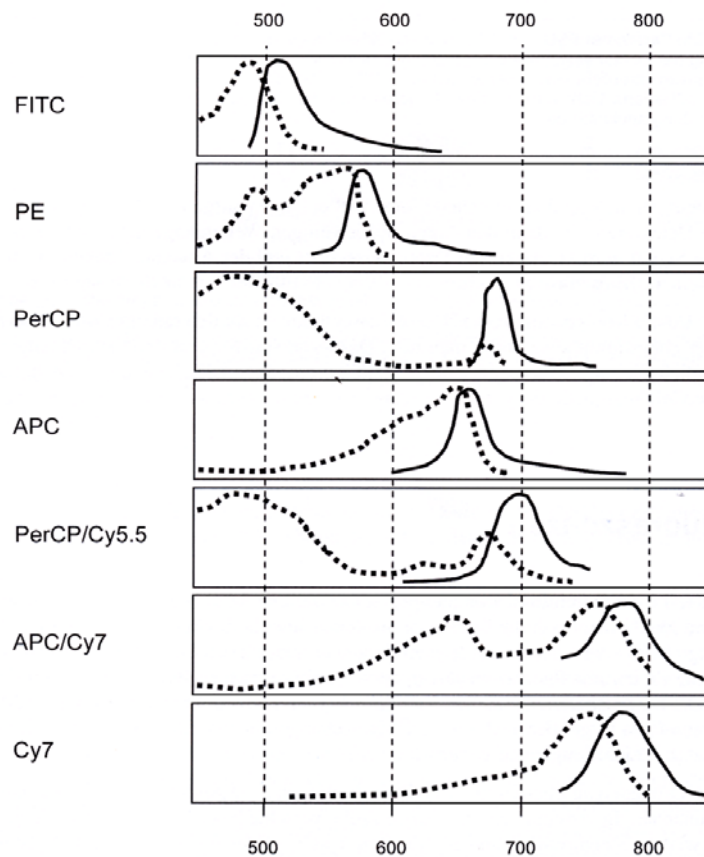
**Abbildung 17: Die Parameter von FSC und SSC.** Das von einem Laser ausgesandte Licht trifft auf eine Zelle. Durch die Streuung der Lichtstrahlen in Verlängerung der Richtung des Laserstrahls wird die Zellgröße bestimmt. (Vorwärtststreulicht oder Forwardscatter = FSC). Das an Strukturen innerhalb der Zelle in einem 90° Winkel reflektierte Licht wird als Seitwärtststreulicht oder Sidescatter (SSC) bezeichnet und gibt die Zellgranulität an.

Das optische System eines Durchflusszytometers umfasst eine ganze Reihe von Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren und fungiert als Schaltzentrale, welche die Aufteilung und Detektion besorgt (Abb. 18). Eine Fokussierungslinse bündelt das von Laser ausgesandte monochromatische Licht, bevor diese in der Meßküvette auf die markierten Zellen trifft. So können die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden, wobei die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers, sowie das durch fluoreszenzmarkierte Antikörper emittierte Licht eine Aussage über Zellgröße, die Granulität der Zellen und die Spezifität der gebundenen Antikörper machen.



**Abbildung 18: Das optische System eines Durchflusszytometers.** Ein Laser sendet Licht in einer bestimmten Wellenlänge aus (488 nm), diese wird fokussiert und trifft in einer Messküvette auf den Probenstrom, so dass es streut und reflektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht in verschiedenen Wellenlängen, wobei ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen auftrennt.

Die Abb.19 zeigt die am häufigsten gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren Absorptions- und Emissionsspektren, welche an Antikörper gekoppelt sind. Auf die ersten beiden, welche oft zum Einsatz kommen, soll hier näher eingegangen werden. Die Abkürzung FITC steht für „Fluorescein- Isothiocyanat und ist ein gelbgrüner Farbstoff mit niedriger Molekularmasse. Bei hohen pH-Werten lässt sich FITC über primäre Aminogruppen leicht an Proteine koppeln. Sein Absorptionsmaximum liegt bei neutralem pH- Wert bei 495 nm und kann deshalb mit einem Argonionlaser der Wellenlänge 488 nm gut angeregt werden. Sein Fluoreszenzemissionsmaximum liegt dann bei 519 nm und das emittierte Licht wird im FL-1 Kanal gemessen. Den zweiten Fluoreszenzfarbstoff stellt das Phycoerythrin (PE) dar, dessen Emissionsmaximum etwa bei 578 nm liegt und deshalb das emittierte Licht im FL-2 Kanal gemessen wird.



**Abbildung 19: Absorptions- und Emissionsspektrum verschiedener Fluorochrome.** Die Abbildung zeigt die Absorptions- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektren (durchgezogene Linie) von sieben häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Die Skalierung gibt den Wellenlängenbereich in nm wieder.

### 2.2.2 Bestimmung der freigesetzten ADMA - Konzentration mittels ELISA

Die Prozedur des ADMA- ELISA [90] teilt sich in mehrere Schritte auf: Die Reagentien sind entweder sofort einsetzbar oder sie müssen frisch nach Anleitung hergestellt werden.

#### Acylierung der Reaktionsplatte

Je 20 µl Standard A-F, jede 20 µl Kontrolle 1&2 und je 20 µl Probe werden in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettiert. Weiter kommen je 25 µl Acylierungspuffer und je 25 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen. Die Reaktionsplatte muss für 10 sek. gemischt werden. Die Reaktionsplatte wird anschließend bei Raumtemperatur für 30 min auf dem



Horizontalschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Ausgleichsreagenz pro Vertiefung, wird die Platte nochmals bei Raumtemperatur für 45 min auf dem Horizontalschüttler inkubieren.

### **Testdurchführung auf Mikrotiterstreifen**

#### *Proben-Inkubation:*

Jeweils 50 µl vorbereitete Standards A-F, Kontrollen und Proben, vorzugsweise als Doppelbestimmung, in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. Weiter je 50 µl Antiserum in jede Vertiefung pipettieren und kurz auf dem Horizontalschüttler mischen. Die Platte mit Haftklebefolie abdecken und über Nacht im Kühlschrank inkubieren.

#### *Waschen:*

Vertiefungen entleeren und mit 250 µl Waschpuffer füllen, für einige Sekunden auf dem Horizontalschüttler mischen und wieder leeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage legen, kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4x wiederholen.

#### *Konjugat-Inkubation:*

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren und 60 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubieren. Die Waschschrte erfolgen wie oben beschrieben.

#### *Substrat-Inkubation:*

100 µl Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 20-30 min bei Raumtemperatur leicht schütteln.

#### *Stoppen der Substrat-Inkubation:*

Je 100 µl der Stopp- Lösung wird in jede Vertiefung pipettiert; dabei unbedingt die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei der Zugabe der Substrat- Lösung.

#### *Messung und Auswertung:*

Die Streifen der Mikrotiterplatte im Photometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm und Referenzwellenlänge von 650 nm messen.

Die Rohdaten der Messung werden an den Standard angeglichen, auf das Gesamtprotein bezogen und letztendlich gemittelt. Die Signifikanz der prozentualen Änderung zur Kontrolle wird mittels T-TEST berechnet.

### **2.2.2.1 ADMA Freisetzung aus humanen DZ durch oxidativen Stress und TNF $\alpha$**

Um einen künstlichen oxidativen Stress in DZ auszulösen stimuliert man sie mit verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M), DMNQ (50  $\mu$ M) und TNF $\alpha$  (10 ng/ml) für 24 h. Die Zellen werden vorsichtig geerntet und deren Überstand bei -20°C, für die Bestimmung der ADMA- Konzentration mittels ELISA, aufbewahrt. Die Zellpellets werden nach mehrmaligem waschen in PBS lysiert und deren Proteinlysate für eine spätere Proteinbestimmung bei -20°C eingefroren.

### **2.2.2.2 Messung der Aktivität des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH**

Dendritische Zellen, werden wie unter 2.2.2.1 beschrieben für 24 h oxidativem Stress und Inflammation ausgesetzt. Nach dem Ernten, zentrifugiert und wäscht man sie 2x mit PBS. Der Überstand wird bei -20°C eingefroren. Die Zellen werden gezählt und pro Stimulanz verwendet man gleiche Zellzahl von 500000. Die Zellen werden in einer Lösung aus M-PER und verschiedenen Enzyminhibitoren 30 min auf Eis lysiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird in frische Reaktionsgefäße pipettiert und pro Stimulanz stellt man zwei Aliquots mit je 450  $\mu$ l her. Zu beiden Aliquots pipettiert man 5 mM ADMA, um die Aktivität der DDAH anzuregen. Pro Stimulationsansatz blockiert man ein Aliquot sofort mit 30 % SSA, um die Aktivität des ADMA metabolisierenden Enzyms zu inhibieren, und friert es bei -20°C ein. Das zweite Aliquot wird für 2 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Aktivität der DDAH zu entfalten und erst danach mit 30 % SSA blockiert [91]. Mit Hilfe des ADMA- ELISA- Kits wird anschließend die verbliebene ADMA- Konzentration in beiden Aliquots gemessen und an hand davon die tatsächliche Aktivität der DDAH errechnet.

### 2.2.2.3 Inkubation dendritischer Zellen mit ADMA

Immature DZ werden mit 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  ADMA für 24 h bei 37°C inkubiert. Diese Konzentrationen wurden gewählt, da sie im klinisch relevanten Bereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  liegen [92]

### 2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zu Beginn kühlt man die Zentrifuge und Reaktionsgefäße auf 4°C ab. Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. DZ werden vorsichtig von den Zellkulturschalen geerntet und 3x mit PBS gewaschen (5 min bei 4°C mit 2000 rpm). Nach der dritten Waschung wird das Zellpellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1ml PBS überführt und 1x mit 13500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Den Überstand verwirft man und extrahiert die Zellen in einer dem Zellpellet angepassten Menge RIPA- Extraktionspuffer für 45 min auf Eis. Es folgt noch ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 13500 rpm für 45 min bei 4°C, um die Proteine vollständig von den Zellresten zu trennen. Die Lysate werden in neu beschriftete Reaktionsgefäße überführt und entweder gleich verwendet oder bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Pierce in transparenten Platten

Die BCA- Lösung wird nach Gebrauchsanweisung aus den Reagentien A und B im Verhältnis 1:100 frisch angesetzt und 200  $\mu\text{l}$  davon zu den mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnten Proteinlysaten gegeben. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 min bei 37°C / 5 %  $\text{CO}_2$ . Währenddessen reduzieren die Proteine im alkalischen Medium  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ . Die Bicinchoninsäure (BCA), welche ein Bestandteil der beiden Kitkomponenten ist, führt sensitiv und selektiv zu einer Chelatbildung von 2 BCA mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ . Dieser entstandene Komplex erscheint in violetter Färbung und kann photometrisch bei 562 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen werden. Die gemessenen Rohdaten der Doppelwerte wurden gemittelt und auf den Proteingehalt des BSA-Standards bezogen.

### 2.2.3.3 Aufbereitung der Proteinlysate für die Gelelektrophorese

Stimulierte DZ werden wie oben beschrieben lysiert und die gewünschte Proteinmenge zunächst mit einer Natriumdodecylsulfat- Lösung (SDS) im Verhältnis 1:9 aufgelöst, um nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zu zerstören. Weiter fügt man noch einen Puffer mit Mercaptoethanol im Verhältnis 1:1 hinzu, um die Disulfidbrücken zu reduzieren, dazu wird die Reaktion auf dem Thermo- Schüttler 5 min gekocht. Die Proben sind sofort einsetzbar, oder können bei -20°C aufbewahrt werden.

### 2.2.3.4 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wird das vertikale Gelelektrophoresesystem X Cell Sure Lock™ Electrophoresis Cell von Invitrogen, den dazugehörigen Gradientengelen und Puffern benutzt.

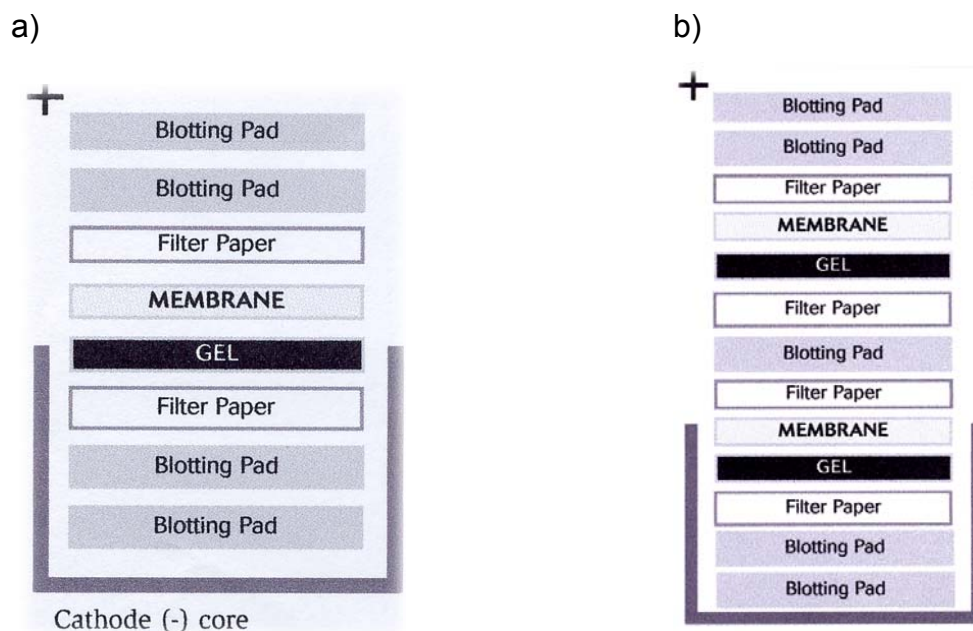
Vor dem Versuch müssen die Gelkammer und das übrige Zubehör mit destilliertem Wasser gut abgespült und danach die fertigen Gradienten- Polyacrylamidgele in die Vorrichtung eingesetzt werden. Die Kammer wird innen und außen mit dem entsprechenden Laufpuffer aufgefüllt bevor man die Kämme aus den Gelen entfernt. Vor dem beladen spült man die einzelnen Taschen vorsichtig mit Puffer aus, um eventuelle Gelreste zu entfernen.

Die fertig vorbereiteten Taschen werden jetzt sowohl mit der entsprechenden Proteinkonzentration mit einem Endvolumen von 20 µl und 5 µl Proteinstandard beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinebenen erfolgt für 60 min mit 200 V. Verwendet werden zweidimensionale Gele, wobei die erste Dimension eine isoelektrische Fokussierung umfasst, das heißt eine Auftrennung nach Ladung in einem pH- Gradienten und die zweite Dimension immer im rechten Winkel zur ersten verläuft und die Proteine nach ihrer Größe durch eine SDS- PAGE fraktioniert. Anschließend wird das Gel entweder auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet, oder mit „Coomassie blue“ für 10-15 min gefärbt, für mehrere Stunden wieder entfärbt, bis die Proteingrößen deutlich sichtbar sind.

### 2.2.4 Arbeiten mit Antikörpern

#### 2.2.4.1 Westernblot und immunologischer Nachweis eines Antigens

Das Gel wird anschließend vorsichtig aus der Gelapparatur gelöst und die fraktionierten Proteine durch ein spezielles Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Abb.20). Dabei wird das Gel in ein Sandwich aus Blottingpuffer getränkte Nitrozellulosemembran, Filterpapiere und Blottingpads gebettet und für 2 h mit 30 V geblottet.



**Abbildung 20: Anordnung des Blot- Systems.** a) Einzel Membran-Sandwich; b) Doppel-Membran-Sandwich

Die so auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine können durch das negativ geladene Ponceau S, welches an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet sichtbar gemacht werden, sofern der Proteintransfer funktioniert hat. Die Membran wird unter leichtem Schütteln für 1 h mit 5 % Milchpulver geblockt und anschließend 4x15 min mit PBS+ 0.05 % Tween 20 gewaschen, um die Milch vollständig zu entfernen. Bei 4°C und über Nacht wird die Membran auf dem

Rollmischer mit dem ersten Antikörper, in einem erfahrungsgemäß rentablen Verhältnis inkubiert. Am folgenden Tag befreit man die Membran durch 4x15 min Waschen von den nicht gebundenen Antikörpermolekülen, bevor sie mit dem Peroxidase gekoppelten Detektionsantikörper, welcher sich an den bereits gebundenen Erstantikörper heftet, für 1 h bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert wird. Nach wiederholtem gründlichem Waschen wird die Membran für 5 min bei Raumtemperatur abgedeckt und in ein Bad aus den Detektionsreagentien, im Verhältnis 1:1 gelegt. Mittels eines Röntgenfilms kann das gewünschte Protein sichtbar gemacht werden.

### **2.2.4.2 Erneutes Färben einer Nitrozellulose Membran**

Diese Methode, auch „membrane stripping“ genannt, benutzt man um bereits gefärbte Membranen auf ein anderes Protein zu untersuchen.

Nach der Entwicklung wird die Membran wiederum 4x15 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Stripping Puffer inkubiert. Danach blockt man die Membran 1 h mit 5 % Milchpulver und wäscht wieder für 4x15 min. Über Nacht wird die Membran wie oben beschrieben mit einem anderen Erstantikörper, beispielsweise  $\alpha$ -Aktin inkubiert. Nach gründlichem Waschen, behandelt man die Nitrozellulosemembran für 1 h mit dem entsprechenden Zweitantikörper, bevor das gewünschte Protein auf dem Röntgenfilm detektiert werden kann.

### **2.2.4.3 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie**

#### *Humane DZ*

Zellen werden vorsichtig von der Platte abgenommen und 2x mit PBS für 5 min bei 4°C mit 1500 U gewaschen. Anschließend wäscht man sie noch einmal in einem speziellen FACS- Puffer, der neben BSA noch Natriumazid enthält. Natriumazid in geringen Konzentrationen konserviert und fixiert die Zellen, ohne ihre Membran zu zerstören. Der Antikörper wird in den FACS- Röhrchen vorgelegt und 100000 Zellen in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l pro Ansatz dazu pipettiert. Die gefärbten Zellen müssen im Dunkeln bei 4°C 30 min inkubieren, bevor die nicht gebundenen

Antikörper mit FACS- Puffer entfernt werden. Aufgenommen in 200 µl PBS sind die gefärbten Zellen für die FACS- Analyse bereit.

### *Murine Zellen:*

Im Gegensatz zu dem FACS- Puffer humaner Zellen, setzt sich dieser für murine Zellen aus PBS mit 1 % BSA und 0.02 % Natriumazid zusammen. Alle Antikörper werden in einer Konzentration von 1 µg/500000 Zellen eingesetzt und 45 min im Dunkeln und bei 4°C inkubiert. Nach der Färbung werden sie 1x mit dem entsprechenden FACS- Puffer gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen.

### **2.2.5 Immunfluoreszierende Färbung muriner Zellen in Chamber Slides**

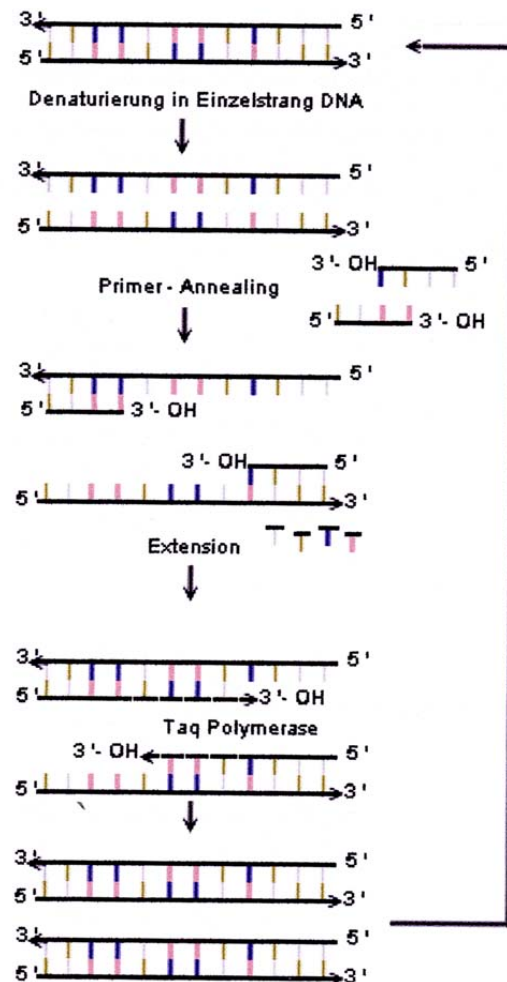
Nach der Adhäsion werden die in den Chamber Slides enthaltenen Objektträger dreimal in HBSS+ HEPES gewaschen und 10 min bei 4°C in eiskaltem Methanol inkubiert. Nachdem das Methanol getrocknet ist, gibt man etwas von dem Farbstoff, entweder Propidiumiodid oder DAPI dazu. Mit einem Deckglas abgedeckt, sind die Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen.

### **2.2.6 Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mit Hilfe der semiquantitative**

#### **Polymerasenketten Reaktion (PCR)**

Die Polymerasenkettenreaktion ist eine *in vitro* Methode, die mit Hilfe definierter Oligonukleotid-Primer DNA-Sequenzen amplifizieren kann. Sie ist eine thermozyklische Reaktion, wobei in jedem Zyklus, die zu Zyklusbeginn bereitgestellte DNA-Menge verdoppelt wird. Die Amplimere, die zu den DNA-Sequenzen von zwei komplementären Strängen passen, umrahmen die Region, die vermehrt werden soll. Haben die Primer gebunden, werden sie in die neusynthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Die Reaktion besteht aus aufeinander folgenden Zyklen mit jeweils drei Schritten (*Abb.21*). Im ersten Zyklus wird die DNA bei 95°C denaturiert und es entstehen zwei neue DNA-Einzelstränge, deren 5'-Ende vom Oligonukleotid- Primer markiert wird und deren 3'-Ende aber variable ist. Der zweite Zyklus beschreibt das Primer- Annealing oder Renaturierung, die normalerweise bei etwa 50-70°C erfolgt. Die beiden neu synthetisierten Stränge dienen dann wiederum als Matrize für die

Synthese komplementärer Stränge mit der gewünschten Länge. Als drittes erfolgt die Extension oder DNA-Synthese, in der Regel bei 70-75°C. Dabei gibt der Primer die 5'-Enden vor: die 3'-Enden sind fixiert, da die Synthese nicht über das Ende des gegenüberliegenden Primers hinausgehen kann. Die DNA- Polymerase ergänzt nun die einzelsträngige DNA zur doppelsträngigen DNA. Hierbei knüpft sie die im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotide komplementär an die freie OH-Gruppe des Zuckers im Nukleotid. Nach nur wenigen Zyklen überwiegen Produkte mit der gewünschten Länge. Zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen von Primern, Nukleotiden oder Polymerase, setzt im letzten Zyklus, nach Ablauf der PCR, die Kühlung auf 4°C ein. Bevor man die PCR startet muss die isolierte RNA als cDNA vorliegen.



**Abbildung 21: Die einzelnen Schritte einer PCR.** In der Abbildung sind die einzelnen Schritte der aufeinanderfolgenden Zyklen einer PCR wie, Denaturierung der DNA, Primer Annealing, sowie die Extension zur Verdeutlichung graphisch dargestellt.



### **RNA- Isolierung mit RNeasy Mini Kit von Qiagen**

Lösungen und Puffer sind im Kit entweder gebrauchsfertig oder werden nach Anleitung frisch zubereitet.

Humane DZ werden geerntet und 2-3 x mit PBS gewaschen. Der Überstand wird komplett verworfen, so dass die Zellpellets trocken sind. Diese löst man in 350 µl RLT- Puffer (10 µl  $\beta$ -ME + 1 ml Buffer). Danach werden die Lysate mit 70 % Ethanol versetzt und vorsichtig mit der Pipette gemischt und 700 µl der Probe auf die Säule gegeben. Nach der 15 Sekunden Zentrifugation mit 10000 rpm verwirft man den Überstand, befeuchtet die Säule mit 350 µl RW1 Puffer, bevor sie erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert werden und auch diesmal der Überstand vollständig entfernt wird. Um restliche DNA zu entfernen inkubiert man die Säule für 15 min bei Raumtemperatur mit einer DNase I-Lösung. Gewaschen wird die Säule wiederum mit 350 µl RW1- Puffer. Es folgen noch zwei weitere Waschungen mit 500 µl RPE- Puffer, bevor die Säulen auf ein frisches Reaktionsgefäß platziert werden und die Eluierung der RNA mit RNase freiem Wasser beginnt. Von dem Eluat wird nun die optische Dichte bestimmt (260 nm für die RNA und 280 nm für Verunreinigungen durch freie Nukleotide und Proteine). Die Konzentration der RNA wird folgendermaßen berechnet: Der gemessene Wert entspricht µg/ml, so dass dieser durch 1000 geteilt werden muss.

### **Reverse Transkription zur cDNA- Herstellung aus RNA mit Omniscript- Kit von Qiagen**

Für die Umschreibung der RNA in cDNA benötigt man 1 µg RNA, den im Folgenden aufgeführten Mastermix (Tabelle 3), sowie  $H_2O_2$ . Das Endvolumen des Reaktionsansatzes umfasst 20 µl und wird 1 h bei 37°C/ 5 %  $CO_2$  inkubiert. Puffer sind im Kit entweder sofort gebrauchsfertig, oder müssen nach Anleitung verdünnt werden.

Komponenten	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Master Mix		
10 x Buffer RT	2 µl	1 x
dNTP Mix (5 mM / dNTP)	2 µl	0.5 mM /dNTP
Oligo-dT Primer (10 µM)	2 µl	1 µM
RNase Inhibitor (10 units / 1 µl)		10 units /20 µl Reaktion
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 units /20 µl Reaktion
RNase-free Water	Variabel	
Template RNA		
Template RNA	Variabel	Bis zu 2 µg /20 µl Reaktion
Endvolumen	<b>20 µl</b>	

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix für die Umschreibung der RNA in cDNA.**

### PCR

Der Ansatz für die eigentliche PCR besteht aus einem im Kit enthaltenen bereits vorgefertigtem, Mastermix, den Primern, der cDNA und H<sub>2</sub>O. Nach Anleitung werden diese Zusätze in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Die Neagtivkontrolle enthält anstelle der cDNA nur Wasser. Nach folgendem Programm wird die PCR für iNOS eingestellt:

5 min: Denaturierung der Doppelstrang- DNA

45 sek: 95°C      Denaturierung der Doppelstrang- DNA

45 sek: 57°C      Annealingtemperatur zur Anlagerung der Primer      } 40

Zyklen

45 sek: 72°C      Anlagerung der dNTPS durch die Taq- Polymerase

7 min: 72°C

4°C

Das Programm für das Protein GAPDH weicht nur in der höheren Annealingtemperatur von 60°C von den bisherigen Einstellungen ab.

### **2.2.7 Bestimmung von CD3 positiven T-Zellen mit einer humanen autologen gemischten Lymphozyten Reaktion (AMLR)**

Die autologe gemischte Lymphozyten Reaktion (AMLR = autologous mixed lymphocyte reaction) dient dem Nachweis der T-Zell vermittelten Immunität und wurde ursprünglich für die Transplantatabstoßung entwickelt. Bestrahlte Zielzellen, werden mit unbestrahlten, aber Fluoreszenz gefärbten Effektorzellen, eines anderen Spenders kokultiviert. Unterscheiden sich Ziel- und Effektorzelle in ihren HLA-Antigenen, werden die T-Zellen in der Lymphozytenkultur zur Proliferation angeregt. Der Nachweis an proliferierten T-Zellen wird durch Markierung des anti CD3-Antikörpers im FACS ermittelt.

50 ml Blut eines gesunden Spenders werden wie in 2.2.1.1 beschrieben über einen Ficoll- Dichtegradienten aufgetrennt und die gewonnenen PBMZ auf Gammaglobulin beschichtete Petrischalen ausgesät. Am 5. Tag werden die noch unreifen DZ gezählt und 100000 Zellen pro well einer 96- well Platte ausgesät und mit 1 µM und 5 µM ADMA für 24 h stimuliert. Am 6. Tag werden die DZ mit 9 Gy 9 min lang bestrahlt um sie in ihrem Zellwachstum zu inaktivieren. Danach werden sie mit autologen grün fluoreszierend gefärbten PBMZ kokultiviert [93]. Nach vier und acht Tagen Kokultivierung erntet man die Zellen, markiert sie mit anti CD3-Antikörper und bestimmt anhand der Fluoreszenzintensität im FACS die T-Zell Proliferation.

### **2.2.8 Bestimmung der Phagozytose- Aktivität DZ**

#### **2.2.8.1 Humane DZ**

Um den Mechanismus der für eine effiziente Antigenaufnahme wichtig ist, wird die endozytotische Kapazität von DZ einerseits mit FITC- Dextran, welches die rezeptorvermittelte Phagozytose detektiert und andererseits die Makropinozytose, nachweisbar durch die Aufnahme von Lucifer Gelb, untersucht.

Immature humane dendritische Zellen werden für 24 h sowohl mit 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M ADMA, als auch 1  $\mu$ g LPS stimuliert. Die Zellen werden am nächsten Tag vorsichtig geerntet und für 5 min mit 1500 U zentrifugiert. Anschließend wäscht man sie unter denselben Bedingungen weitere zweimal. Pro Ansatz, der einzelnen Stimulanzien, sowie Positiv- und Negativkontrolle setzt man 250000 Zellen ein. Die einzelnen Proben werden entweder mit 1 mg/ml FITC- Dextran oder 1 mg/ml Lucifer Gelb in einem Endvolumen von 1 ml für eine Stunde auf dem Rotor bei 37°C/ 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden die Zellen 10 min mit 1500 rpm zentrifugiert und deren Pellet weitere dreimal mit HBSS gewaschen. Ihre Phagozytose- Aktivität kann man mittels Fluoreszenzintensität im FACS bestimmen, da FITC- Dextran und Lucifer Gelb ein Exzitationsmaximum zwischen 488 nm und 490 nm und ein Emissionsmaximum von 520 nm besitzen. Je höher die Fluoreszenzintensität ist, desto mehr des Fluoreszenzfarbstoffes wurde von den Zellen aufgenommen und desto größer ist ihre Phagozytose Kapazität. Sowohl die rezeptorvermittelte Phagozytose, als auch die Makropinozytose kann durch spezielle Inhibitoren geblockt werden.

### **2.2.8.2 Murine BMDZ**

Murine BMDZ werden ebenfalls im immaturren Zustand verwendet und als Nachweis für die beiden Phagozytose Mechanismen dient ebenfalls 1 mg/ml FITC- Dextran und 1 mg/ml Lucifer Gelb. Die Verfahrensweise des Versuchs gleicht der unter 2.2.8.1 beschriebenen Methode.

### **2.2.9 Vaskuläre Invasion muriner DDAH-1 über exprimierter BMDZ**

Konfluent gewachsene MEZ (s. 2.2.1.5) werden mit PBS gewaschen und mit Trypsin- EDTA 10 min bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> abtrypsiniert. Die Reaktion wird mit phenolrotfreiem DMEM +10 % FCS gestoppt und die Zellen nach einigen Waschschritten gezählt. Anschließend sät man pro Vertiefung einer weißen 96- Napf Platte 13500 MEZ aus und lässt sie für 24 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> adhären, damit sie einen konfluenten Zellrasen bilden. Zur Sichtkontrolle werden auch einige Vertiefungen einer klaren 96-Napf Platte mit MEZ bestückt. Die zu immaturren DZ kultivierten BMDZ werden geerntet und mit Serum- und phenolrotfreiem DMEM

gewaschen und gezählt. Pro Vertiefung der weißen und klaren Kontrollplatte benötigt man 20000 DZ. Die entsprechende Anzahl von DZ nimmt man in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in 1 ml serumfreiem Medium mit 10 –25 µM Cell Tracker CMFDA auf und inkubiert diesen Ansatz für 45 min bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub>. Cell Tracker Green CMFDA ist eine zellmembranpermeable Substanz, welche eine Chloromethylgruppe enthält und mit Thiolen reagiert. Durch die Reaktion von CMFDA mit intrazellulären Esterasen und Gluthation- S- Transferase entstehen grün fluoreszierende Chloromethylderivate des Fluorescein Diacetat, welche die Zelle nicht mehr verlassen können. Die zytosolische Färbung der Zellen bleibt für mindestens 72 h und mindestens vier Zellteilungen erhalten, nimmt aber pro Zellteilung an Fluoreszenzintensität ab. Ihre Fluoreszenz kann bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission im Fluoreszenzreader gemessen werden. Für eine optimale Begasung der Zellen befinden sich in den Deckeln der Reaktionsgefäße kleine Löcher. Danach zentrifugiert man die Zellen für 10 min 1500 U ab und resuspendiert sie diesmal in serumhaltigem Vollmedium bevor sie für weitere 30 min bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Während dieser Zeit verwirft man den Überstand der MEZ in der weißen und klaren Platte und inkubiert dies für 15 min bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> mit je 100 µl HBSS+ HEPES pro Napf. Vor der Koinkubation der MEZ mit den murinen BMDZ wird das Zellpellet in 1 ml HBSS+ HEPES aufgenommen und die Zellen nochmals gezählt. Die entsprechende Zellzahl von 20000 Zellen pro Napf wird nun in die Vertiefungen mit den adhären MEZ pipettiert. Zusätzlich wird der gleiche Ansatz in so genannten „Chamber Slides“ durchgeführt, die Zellen später anzufärben und im Fluoreszenzmikroskop zu betrachten. Die Platten werden sofort auf einem Schüttler für 4h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle dienen MEZ ohne murine BMDZ. Nach Ablauf der Adhäsionszeit wird die Platte sofort im Fluoreszenzreader bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission gemessen. Dieser Wert dient zur Eichung für alle weiteren Messungen. Der Überstand der Platte wird verworfen und die einzelnen Vertiefungen mit einer Mehrkanalpipette mit je 100µl mit HBSS + HEPES gewaschen und gleich wieder gemessen. Diese Prozedur erfolgt genau fünfmal.

Ausgewertet wird der Versuch, indem man die erste Messung, gleich nach Beendigung der Adhäsion zur Eichung der Färbungsintensitäten der BMDZ verwendet. Die Anpassung der einzelnen Färbungsintensitäten erreicht man, indem ein Faktor aus dem Quotienten Mittelwert der Neunfachwerte der verschiedenen Stimulationsansätze und Mittelwert der unstimulierten Kontrolle bestimmt wird. Des

Weiteren wird ein Quotient aus dem Mittelwert der Waschungen 3-5 und dem Faktor gebildet und bezieht diesen auf die unstimulierte Kontrolle. Die Signifikanz der Ergebnisse wird mittels T-Test bestimmt.

### **2.2.10 Statistik**

Alle in der Arbeit dargestellten Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben (MW  $\pm$  SD). Allgemein wurde die Signifikanz von absoluten oder prozentualen Änderungen zur Kontrolle bzw. Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen mittels T-Test bzw. ANOVA berechnet und bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  angenommen.

Statistische Analysen der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10.0 erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung humaner myeloider DZ aus Vollblut gesunder Probanden

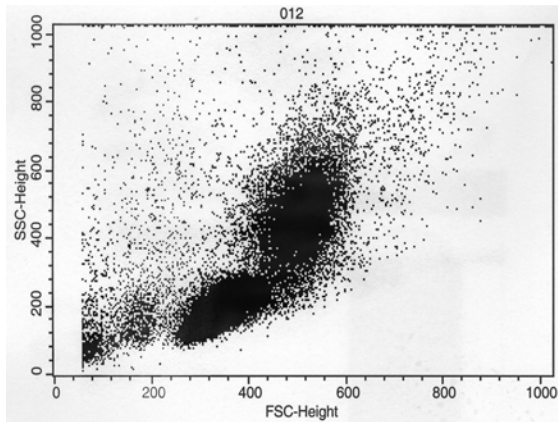
Zur Veranschaulichung und genaueren Auswertung der im Durchflusszytometer gemessenen immaturen Zellen wurden diese als Punktwolken Diagramme dargestellt. Jede sich abgrenzende Wolke entsprach einer eigenen Zellpopulation. *Abb.22a*) zeigt die Gesamtpopulation der PBMZ, beginnend im linken unteren Bildrand mit sogenannten Zelltrümmern. Anschließend folgt eine kleine Population T-Zellen, welche von geringer Größe und wenig granuliert sind. Zellen der zweitgrößten Population haben deutlich an Zellgröße und Granulität dazu gewonnen und werden als Monozyten charakterisiert. Die sowohl von Zellzahl, als auch Zellgröße und Granulität umfangreichste Wolke, entspricht die der Lymphozyten. Die eingekreiste Wolke in *Abb.22b*) zeigt eine Population von DZ, die sich von den restlichen Populationen durch Zellgröße und Granulität deutlich absetzt. Für diese definierte Population wurden im Folgenden die einzelnen Oberflächenmarker an Hand von Einzel- oder Doppelfärbungen bestimmt. Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde immer die entsprechende Isotypkontrolle benötigt, die wie in *Abb.22c*) keinerlei Signale zeigte. Ebenfalls keine positiven Signale zeigten die Dendriten Population für CD14, ein Marker für Monozyten, siehe *Abb.22d*).

Im Gesamtüberblick waren 63 % der DZ, ohne Berücksichtigung der kleineren Zellen und Zelltrümmer, doppelt positiv für CD11a und DC-SIGN (*Abb.22e*). Dies bedeutet, dass ungefähr 9 % der Zellen für CD11a und 21 % der Zellen für DC-SIGN einfach positiv waren. Die Einzelfärbung von CD11c zeigte eine eindeutig positive Färbung von 99 % (*Abb.22f*). Der Reifemarker CD83 ist wie erwartet mit nur 4.5 % in der Gesamtpopulation der DZ exprimiert. *Abb.22g* zeigt eine Einfachfärbung von CD83. Auch CD80, ein Marker für B7.1, war bei immaturen DZ nur wenig ausgeprägt, welches sich in der deutlich niedrigen Expression von 2 % widerspiegelt (*Abb.22h*). In *Abb.22i*) ist eine signifikant hohe Expression von CD86, einem Marker für B7.2, zu sehen, welche auf eine verstärkte Ausreifung DZ zurück zu führen ist. Für die Doppelfärbung von HLA-DR und BDCA-1 erhielt man folgendes Ergebnis. Die Anzahl der einfach positiven Zellen für HLA-DR dominierte mit 91 % gegenüber den

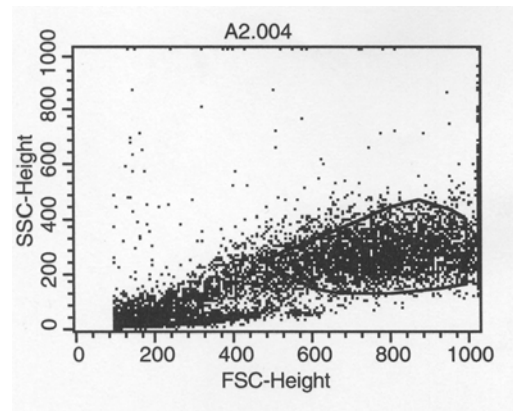
### 3. Ergebnisse

einfach positiven BDCA-1 gefärbten DZ mit 0.18 % und den doppelt positiven DZ mit 0.91 % (Abb.22g).

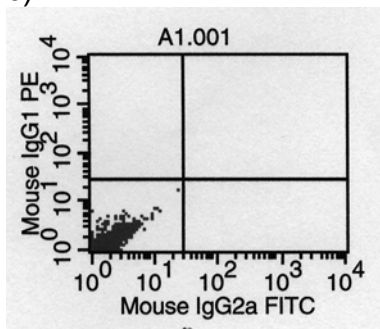
a)



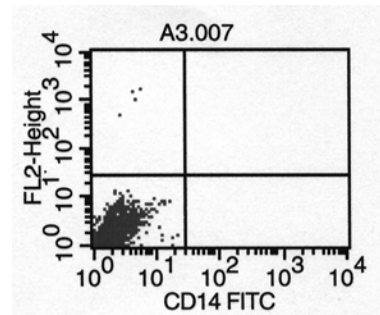
b)



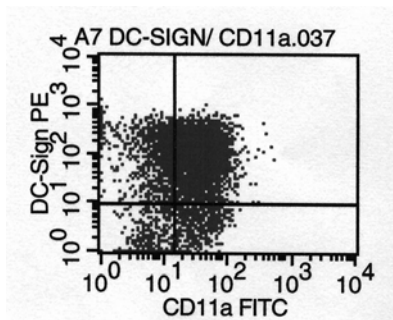
c)



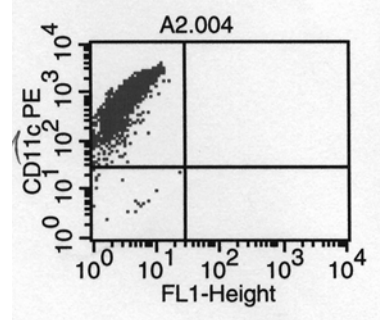
d)



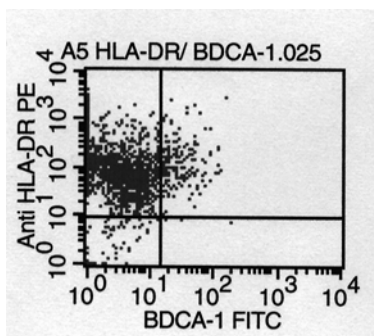
e)



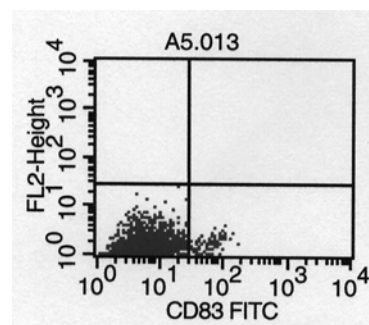
f)



g)



h)



i)

j)

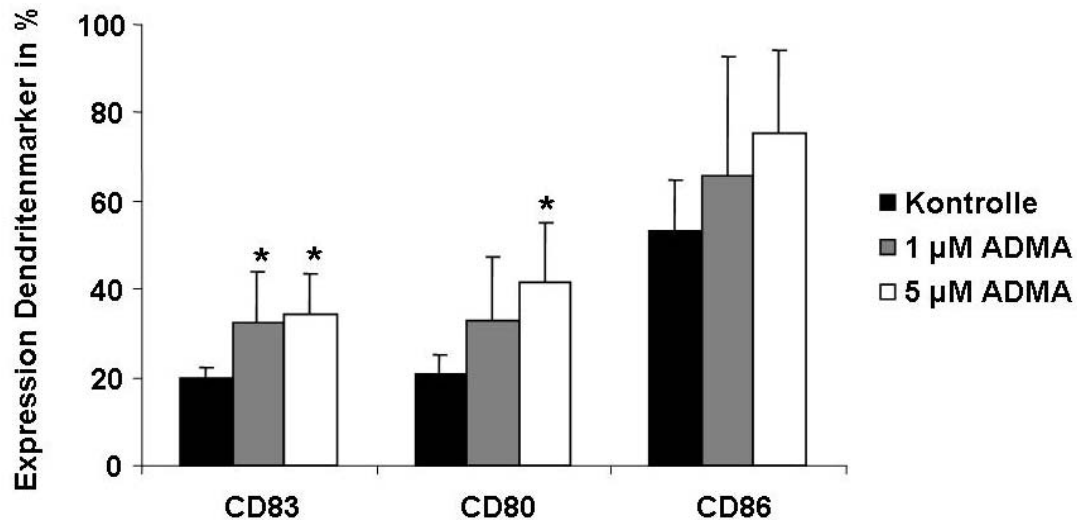




**Abbildung 22: FACS- Analyse der hDZ.** a) Gesamtpopulation der PBMZ, b) Gesamtpopulation der DZ, c) Isokontrolle, d) Expression von CD14 positiven Zellen, e) Doppelfärbung von DC11a / DC-SIGN, f) Expression von CD11c positiven Zellen, g) Doppelfärbung von BDCA-1 / HLA-DR, h) Expression von CD83 positiven Zellen, i) Expression von CD80 positiven Zellen, j) Expression von CD86 positiver Zellen.

#### 3.1.1 Expression von typischen dendritischen Zellmarkern unter dem Einfluss von ADMA

Humane immature DZ wurden mit 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M ADMA für 24 h stimuliert und anschließend die Expression von CD83, CD80 und ICAM-1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zugabe von ADMA führte zu einer schnelleren Ausreifung der Zellen, welches sowohl durch die deutlich erhöhte Expression von CD83 (ADMA 1  $\mu$ M: +39 %,  $p < 0.04$  und ADMA 5  $\mu$ M: +43 %;  $p < 0.01$ ) als auch CD80 (ADMA 1  $\mu$ M: +36 %; und ADMA 5  $\mu$ M: +50 %;  $p < 0.01$ ) erkennbar war (Abb.23). Die tendenzielle Hochregulierung von CD86 zeigte keine signifikanten Unterschiede.

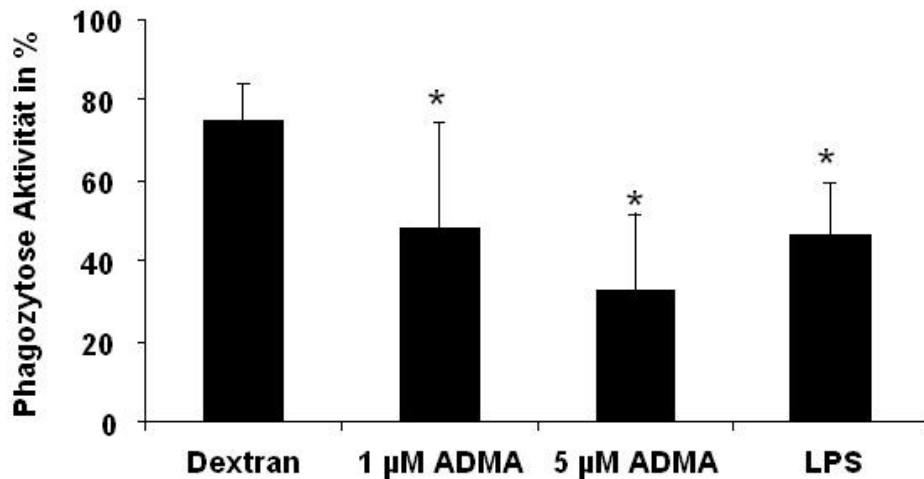


**Abbildung 23: Expression der Dendritenmarker CD83, CD80 und CD86.** Mit ADMA stimulierte DZ zeigen eine erhöhte Expression von CD83, CD80 und CD86, welches die schnellere Ausreifung der DZ durch ADMA widerspiegelt, mit  $p < 0.05$  und  $n = 4$ .

## 3.2 Einfluss von ADMA auf die Phagozytose- Aktivität und endozytotische Moleküle humaner DZ

### 3.2.1 Rezeptorvermittelte Phagozytose

Nach der Erkenntnis, dass ADMA die DZ- Maturierung positiv begünstigt, stellte sich die Frage, ob ADMA ebenso Effekte auf die phagozytotische Aktivität DZ ausübt. Dazu wurden humanen DZ am 5. Tag, im immaturren Zustand, mit 1 µM, 5 µM ADMA, sowie LPS für 24 Stunden inkubiert und am folgenden Tag deren Phagozytose- Aktivität mittels FITC- Dextran (1 mg/ml) analysiert. FITC- Dextran ist ein grün fluoreszierender Farbstoff der über die rezeptorvermittelte Phagozytose von den Zellen aufgenommen wird. Die im FACS gemessene Intensität des aufgenommenen FITC- Dextran entsprach der Phagozytose- Aktivität der Zellen. Unter dem Einfluss von ADMA 1 µM: (- 36 %;  $p < 0.05$ ), ADMA 5 µM: (- 56 %;  $p < 0.003$ ) und 10 ng/ml LPS: (- 38 %;  $p < 0.009$ ) zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikant reduzierte rezeptorvermittelte Phagozytose- Aktivität (Abb.24).

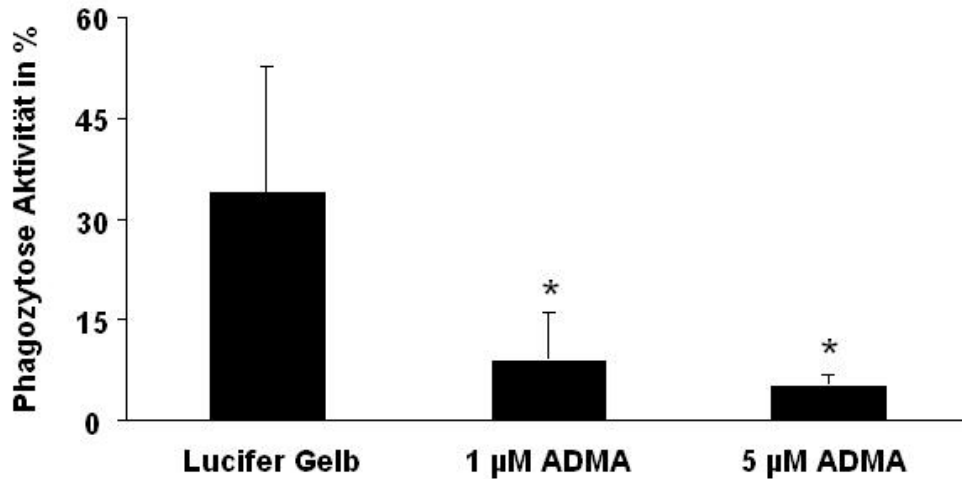


**Abbildung 24: Rezeptorvermittelte Phagozytose humaner DZ.** Humane immature DZ wurden mit ADMA und LPS für 24 h stimuliert, geerntet und für 1h bei 37°C/5 %CO<sub>2</sub> mit FITC- Dextran, einem Marker für die rezeptorvermittelte Phagozytose inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Phagozytose- Kapazität der Zellen mit Hilfe der FACS- Analyse bestimmt und man erkannte einen deutlichen Rückgang unter dem Einfluss von ADMA,  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

#### 3.2.2 Makropinozytose

Makropinozytose ist ein Mechanismus der Endozytose bei dem extrazelluläres Material, hier der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Gelb, über große pinozytäre Vesikel aufgenommen wird.

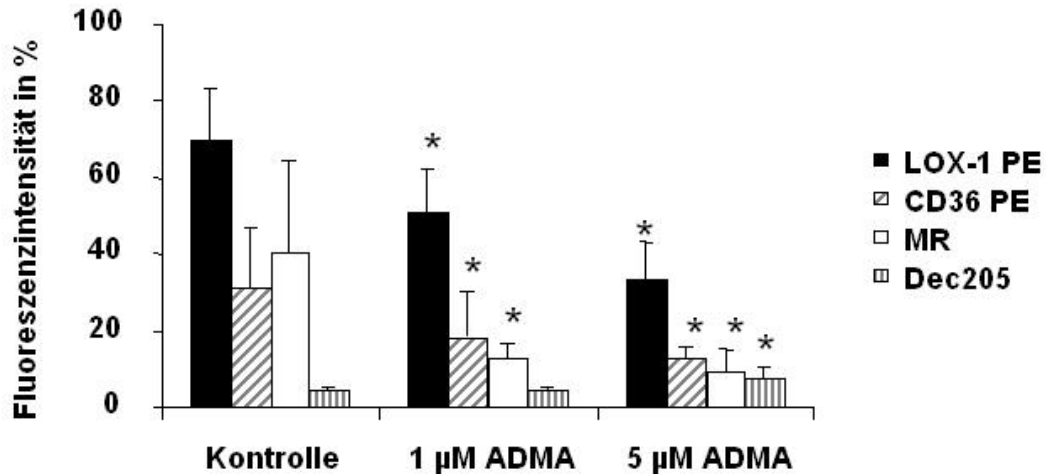
Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt. Der Nachweis der Makropinozytose erfolgte diesmal nicht mit FITC- Dextran, sondern mit Lucifer Gelb, jedoch ebenfalls über Bestimmung der Fluoreszenzintensität im FACS. Obwohl die Intensität der rezeptorvermittelten Phagozytose mit 55 % über der Kapazität der Makropinozytose lag, erkannte man auch hier einen signifikanten Rückgang der Phagozytose- Aktivität mit zunehmender ADMA- Konzentration (Abb.25), ADMA 1 µM (-74 %;  $p < 0.02$ ) und ADMA 5 µM (-85 %;  $p < 0.01$ ), im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.



**Abbildung 25: Makropinozytose humaner DZ.** Humane immature DZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ADMA für 24 h stimuliert, geerntet und für 1 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> mit Lucifer- Gelb, einem Marker der Makropinozytose inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Phagozytose- Kapazität der Zellen mittels FACS- Analyse bestimmt und man erkannte ebenfalls einen deutlichen Rückgang unter dem Einfluss von ADMA,  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

#### 3.2.3 Expression verschiedener Scavanger Rezeptoren, wie CD36, LOX-1, Dec205 und des Mannose Rezeptors

Resultierend aus der schnelleren Ausreifung der DZ durch ADMA und der damit verbundenen verringerten rezeptorvermittelten Phagozytose- Aktivität, untersuchten wir die Expression verschiedener Scavenger Rezeptoren unter den besagten Bedingungen. In Abb 26 ist die verminderte Expression von CD36 (ADMA 1 µM: -27 %;  $p < 0.05$  und ADMA 5 µM: -77 %;  $p < 0.03$ ), LOX-1 (ADMA 1 µM: -14 %;  $p < 0.03$  und ADMA 5 µM: -29 %;  $p < 0.002$ ) sowie des Mannose Rezeptors (ADMA 1 µM: -84 %;  $p < 0.02$  und ADMA 5 µM: -73 %;  $p < 0.02$ ), mit zunehmender Konzentration von ADMA deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu den übrigen Scavenger Rezeptoren wurde Dec205 unter dem Einfluss von ADMA, stärker exprimiert (ADMA 5 µM: +75 %;  $p < 0.04$ ). Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass Dec205 für die rezeptorvermittelte Phagozytose keine bedeutende Rolle spielt, sondern eher an der Aufnahme viraler Bestandteile beteiligt ist.



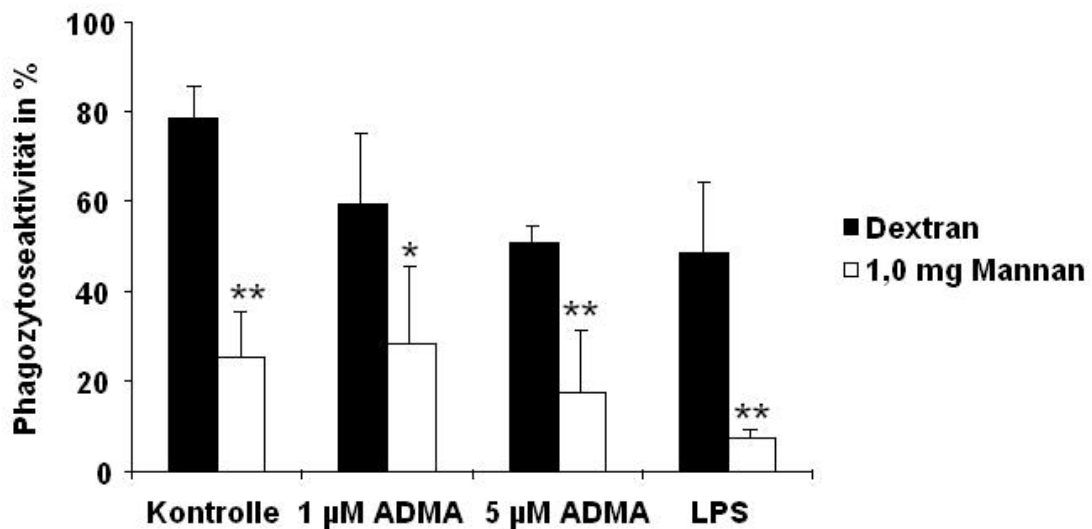
**Abbildung 26: Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LOX-1 und MR.** Humane DZ zeigten unter dem Einfluss von ADMA eine deutlich verringerte Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LOX-1 und des Mannose Rezeptors. Der Nachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie.  $P < 0.05$  und  $n = 5$ .

### 3.3 Reduktion der DZ-Phagozytose durch spezielle Inhibitoren

#### 3.3.1 Reduktion der rezeptorvermittelten Phagozytose durch Mannan

Durch die Erkenntnis, dass ADMA die Expression der oben erwähnten Scavenger Rezeptoren und phagozytotischen Moleküle deutlich verminderte, war es von großem Interesse welche der beiden Endozytose-Mechanismen, die rezeptorvermittelte Phagozytose oder die Makropinozytose, für DZ, unter dem Einfluss von ADMA, eine bedeutendere Rolle spielt. Dazu wurden immature humane DZ wiederum für 24 h mit ADMA stimuliert und vor der Zugabe von FITC- Dextran mit 1mg/ml Mannan, einem spezifischen Inhibitor für die rezeptorvermittelte Phagozytose, inkubiert. Anschließend bestimmte man die Phagozytoseaktivität anhand der Fluoreszenzintensität des aufgenommenen FITC- Dextran im Durchflusszytometer. Dabei ergab sich eine signifikante Reduktion der Phagozytose Kapazität der unstimulierten Zellen (-68 %;  $p < 0.0008$ ), sowie für ADMA 1 µM (-53 %;  $p < 0.03$ ), ADMA 5 µM (-55 %;  $p < 0.009$ ) und LPS (-84 %;  $p < 0.005$ ). Die verstärkte

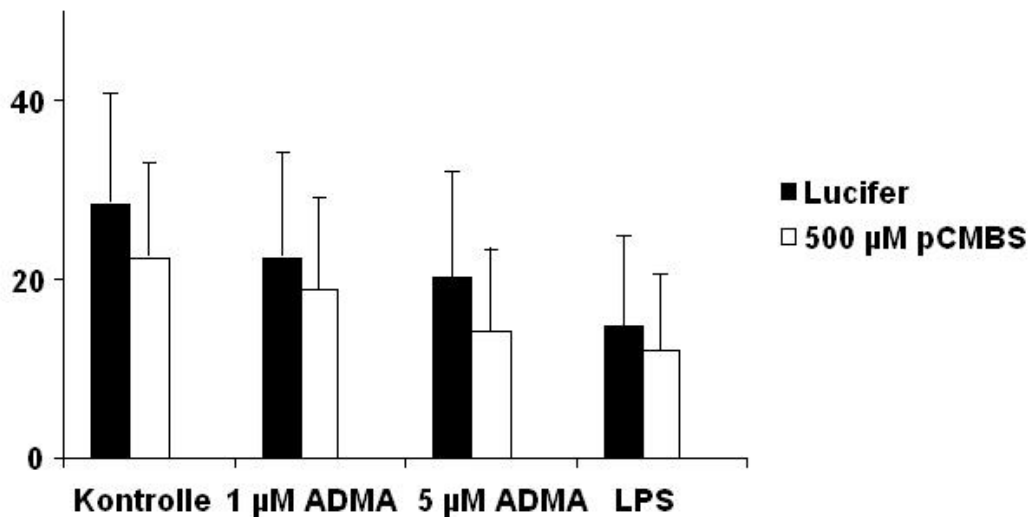
Abnahme korrelierte mit zunehmender ADMA- Konzentration, entsprechend des herkömmlichen Phagozytose Tests ohne Inhibitor (Abb.27). Der drastische Rückgang der Phagozytose- Kapazität der LPS stimulierten Zellen, war durch die LPS induzierte schnellere und stärkere Ausreifung der DZ, wodurch die phagozytotische Wirkung weitgehend verloren ging, zu erklären.



**Abbildung 27: Reduktion der Phagozytose durch Mannan.** Abnahme der rezeptorvermittelten Phagozytose- Aktivität in ADMA stimulierten humanen DZ, ausgelöst durch Mannan. Unstimulierte DZ stellten die Kontrolle dar.  $p < 0.05$ ;  $n = 3$

#### 3.3.2 Reduktion der Makropinozytose durch pCMBS

Im Gegensatz zu der deutlich verminderten rezeptorvermittelten Phagozytose- Aktivität, zeigte die Inhibierung der Makropinozytose mit 500 µM pCMBS keine signifikante Reduktion (Abb.28), sondern nur eine tendenzielle Abnahme der Kontrollzellen (-21 %), für ADMA 1 µM (-16 %), ADMA 5 µM (-29 %) und LPS (-17 %).



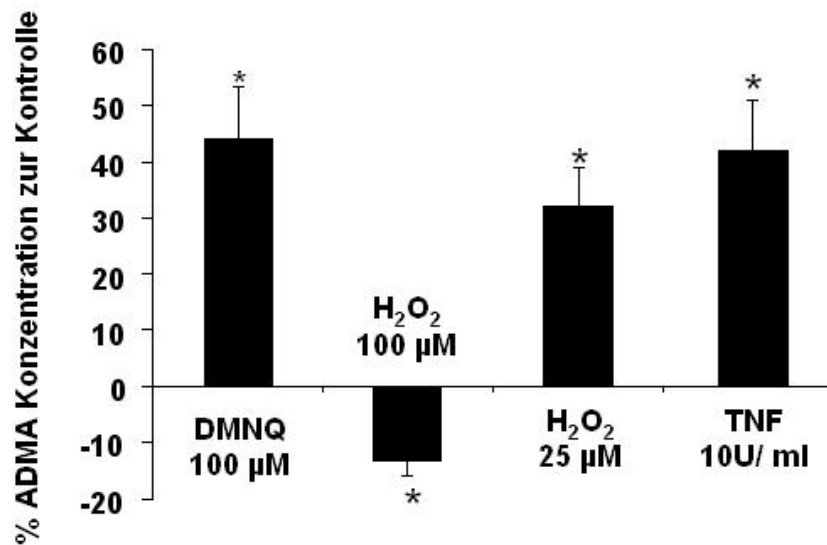
**Abbildung 28: Reduktion der Makropinozytose durch pCMBS.** Tendenzielle Reduktion der Makropinozytose unter dem Einfluss von ADMA und LPS.

### 3.4 Auswirkung von oxidativem Stress und Inflammation auf DZ

#### 3.4.1 Freisetzung von ADMA aus DZ unter oxidativem Stress und TNF $\alpha$

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, war es nun von Interesse ob humane DZ in der Lage sind eigenständig ADMA zu sezernieren. Dazu wurden DZ am fünften Tag, im immaturren Zustand 24 h oxidativem Stress ausgesetzt oder mit dem inflammatorischen Zytokin TNF $\alpha$  stimuliert. Aus dem Zellüberstand wurde mit Hilfe des ADMA- ELISA die sezernierte ADMA- Konzentration gemessen. Zuvor wurden die Zellen mittels FACS- Analyse an hand von bestimmten Markern auf deren Reinheit und Reifegrad überprüft.

Die Auswertung des verwendeten ADMA- ELISA ergab, dass im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, welche unter normalen Kulturbedingungen 0.8-1.0  $\mu$ mol ADMA sezernierten, stimulierte humane DZ in der Lage sind unter oxidativem Stress und TNF $\alpha$  weit mehr ADMA freizusetzen (Abb.29). Es zeigte sich nach einer 24 stündigen Stimulation mit 100  $\mu$ M DMNQ, 25  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100 U/ml TNF $\alpha$  ein signifikanter Anstieg der ADMA- Konzentration in den entsprechenden Zellüberständen. Konzentrationen von 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatten toxische Effekte auf die Zellen, so dass diese abstarben und kein ADMA freisetzen.

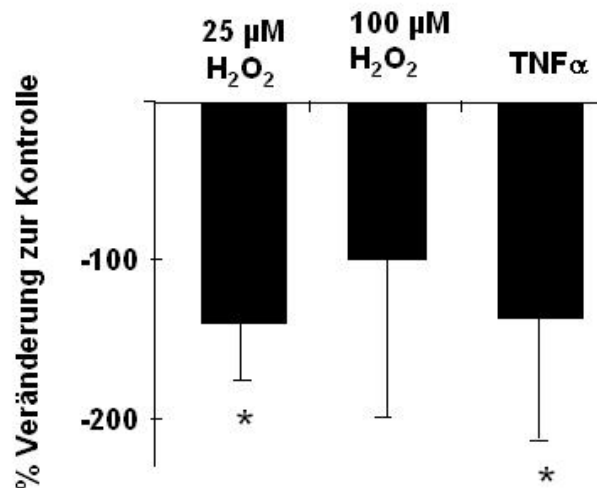


**Abbildung 29: Freisetzung von ADMA aus humanen DZ.** Erhöhte ADMA- Sekretion aus humanen DZ unter oxidativem Stress und TNF $\alpha$ . Gemessen mit einem dazu speziell entwickeltem ELISA;  $p < 0.05$  und  $n = 4$ .

#### 3.4.2 Bestimmung der DDAH- Aktivität unter oxidativem Stress und Inflammation

Aufgrund der erhöhten ADMA- Sekretion, ausgelöst durch oxidativen Stress und Inflammation, stellte sich die Frage wie sich das ADMA metabolisierende Enzym DDAH unter diesen Bedingungen verhält. Humane immature DZ wurden erneut für 24 h oxidativem Stress und TNF $\alpha$  ausgesetzt und anschließend mit Hilfe eines speziellen Versuches, die Aktivität von DDAH ermittelt. Sowohl oxidativer Stress (25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: -140 %) als auch Inflammation (100 U/ml TNF $\alpha$ : -138 %) wirkten sich negativ auf die Enzymaktivität aus, so dass diese im Vergleich zu den Kontrollzellen um ein Vielfaches gesenkt wurde (Abb.30).



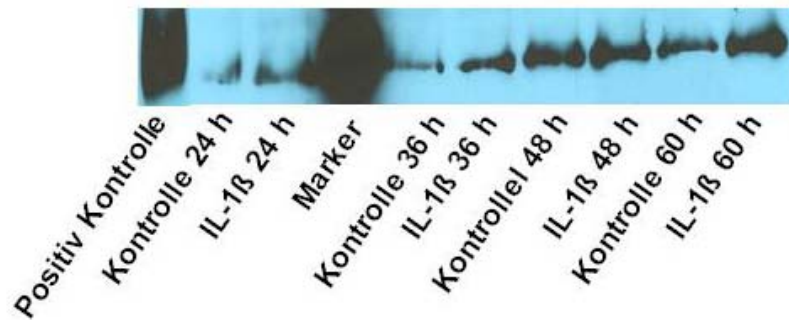


**Abbildung 30: Nachweis der DDAH-Aktivität.** Bestimmung der DDAH- Aktivität unter dem Einfluss von oxidativem Stress und Inflammation.

## 3.5 Zytokin induzierte Expression von NO

### 3.5.1 Zeitabhängige Induktion der iNOS Expression durch IL-1 $\beta$

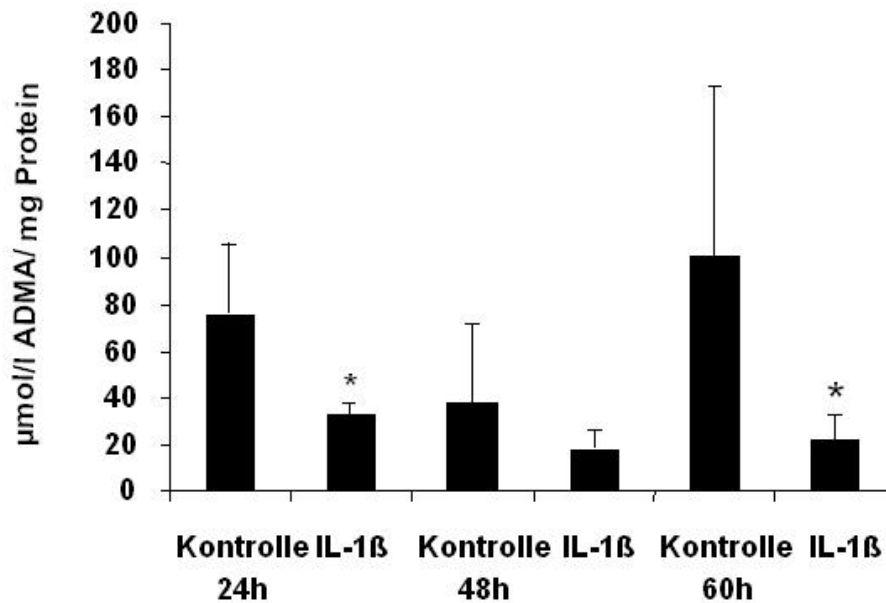
Um herauszufinden ob das ADMA/DDAH- System die Zytokin induzierte NO-Produktion reguliert wurden humane DZ am 5. Tag im immaturren Zustand, mit 100 U/ml des inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  für 24 h, 36 h, 48 h und 60 h inkubiert. Die vollständig lysierten Zellen wurden der Westernblot-Analyse wie unter 2.1.3.2.1 beschrieben, unterzogen [94] und zeigten auf Proteinebene eine zeitabhängige zunehmend erhöhte Expression von iNOS (Abb.31), welche sich nach 24 h bis 36 h verdoppelte und nach weiteren 48 h um das 2,8 fache anstieg. Ihr Maximum erreichte sie nach 60 h. Der Wert lag um das 3.5 fache über dem der unstimulierten Kontrollzellen.



**Abbildung 31: Induktion von iNOS durch IL1 $\beta$ .** Immature humane DZ, stimuliert mit 100 U/ml IL-1 $\beta$  für 24, 36, 48 und 60 Stunden zeigten im Gegensatz zur Kontrolle eine zeitabhängige verstärkte Induktion der iNOS- Expression.

#### 3.5.2 Zeitabhängige Reduktion von ADMA durch IL-1 $\beta$

Zusätzlich zu der durch IL-1 $\beta$  zeitabhängig verstärkt induzierten Expression von iNOS, ergab sich nach der Bestimmung der ADMA- Konzentration aus den Zellüberständen, mittels ELISA, entsprechend der erhöhten iNOS Expression eine signifikante Abnahme der ADMA Konzentration nach 24 h (-57 %;  $p < 0.02$ ) und 60 h (-78 %;  $p < 0.04$ ), bei gleichzeitiger Hochregulation der DDAH-Aktivität (Abb.32) [95]. Eine ähnliche rückläufige Tendenz der ADMA Konzentration ließ sich auch nach einer Inkubation von 48 h (-51 %) nachweisen.



**Abbildung 32: Reduktion von ADMA durch IL-1 $\beta$ .** Gemessene ADMA- Konzentration nach Stimulation der Zellen mit 100 U/ml IL-1 $\beta$  für 24 h, 48 h und 60 h. Entsprechend zu der unter 3.7 gezeigten zeitabhängigen Induktion von iNOS ergab sich eine zeitabhängige Reduktion der ADMA- Expression verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen;  $p < 0.05$  und  $n = 4$ .

#### 3.5.3 Konzentrationsabhängige Reduktion der iNOS Expression durch ADMA

Die funktionale Rolle von ADMA auf die Expression von iNOS wurde mit humanen immaturren DZ, nach einer 24 h Stimulation mit unterschiedlich hohen ADMA Konzentrationen (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und 100 U/ml IL-1 $\beta$  durch Westernblot bestimmt (Abb.33). Zum Vergleich wurde in den IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen iNOS selektiv mit Aminoguanidin geblockt [96]. Mit zunehmender ADMA- Konzentration erkannte man eine deutlich verminderte Expression von iNOS (ADMA 5  $\mu$ M: -66 % und ADMA 10  $\mu$ M: -94 %), im Vergleich zu den IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen. Auch die Inhibierung von iNOS mit Aminoguanidin führte zum erwünschten Erfolg. Dasselbe Ergebnis wurde mittels PCR erzielt, welches zur Veranschaulichung unter 3.5.4 dargestellt ist.

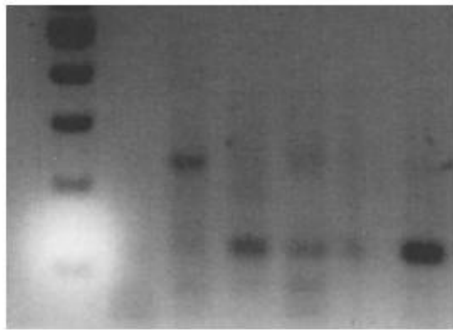


**Abbildung 33: Reduktion von iNOS durch ADMA.** Immature humane DZ für 24 h mit 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M ADMA behandelt, zeigten eine reduzierte iNOS- Expression mit zunehmender ADMA- Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen.

#### 3.5.4 Nachweis von iNOS auf DNA- Ebene

Immature humane DZ wurden wie unter 3.4.3 mit verschiedenen Konzentrationen von ADMA und IL-1 $\beta$  für 24h stimuliert. Anschließend isolierte man die RNA aus den Zellen und bereitete diese nach Vorschrift, wie in 2.2.5 beschrieben, für die PCR vor. Die PCR- Produkte wurden auf ein 1.8 % Agarosegel aufgetragen, da iNOS bei einer Größe von 124 bp zu erkennen ist. Die *Abb.34a* zeigte den deutlichen Rückgang der iNOS Expression mit steigender ADMA- Konzentration. Zusätzlich ersichtlich war, dass PBMCs weder auf Protein- noch auf DNA- Ebene iNOS exprimieren. IL-1 $\beta$  führte zu einer verstärkten Induktion von iNOS. Das zweite Gelbild *Abb.34b* zeigte die konstitutive Expression des „House Keeping Gen“ GAPDH bei etwa 500 bp, welches als Kontrolle galt.

a)



Marker  
PBMCs  
DCs  
Kontrolle  
1 µM ADMA  
5 µM ADMA  
Neg.Kontrolle  
IL-1β

b)

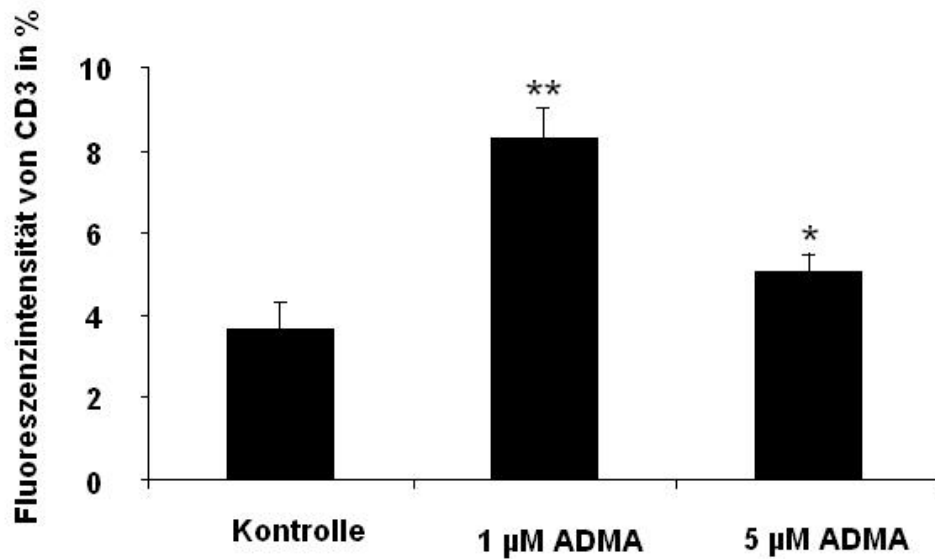


IL-1β  
5 µM ADMA  
1 µM ADMA  
Kontrolle  
DZ  
PBMZ  
Neg.Kontrolle  
Marker

**Abbildung 34: Nachweis von iNOS.** a) Konzentrationsabhängige Reduktion der iNOS Expression durch ADMA. b) Konstitutive Expression von GAPDH (Kontrolle).

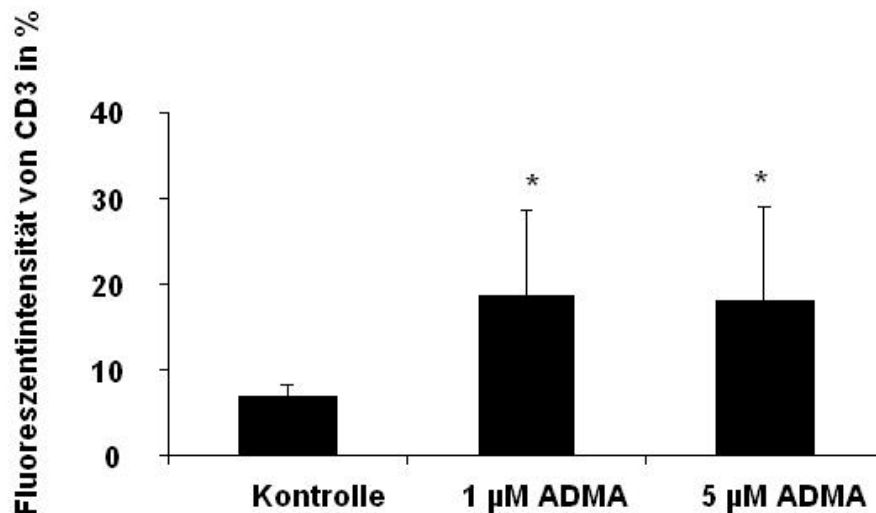
### 3.6 Aktivierung von CD3 positiven T-Zellen durch ADMA

Es ist bekannt, dass DZ die effektivsten Antigen präsentierenden Zellen sind, mit der Eigenschaft T-Zellen zu aktivieren. Deshalb sollte die Fähigkeit von ADMA stimulierten DZ, CD3 positive T-Zellen zu aktivieren, mit einer autologen gemischten Lymphozyten Reaktion getestet werden. Dazu wurden humane immature DZ für 24 h mit 1 µM und 5 µM ADMA vorstimuliert und anschließend mit γ- Röntgenstrahlen inaktiviert, bevor man sie zusammen mit grün- fluoreszierenden autologen humanen PBMZ für mehrere Tage kokultivierte. Die aktivierten CD3 positiven T-Zellen bestimmte man an Hand ihrer Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer (Abb.35). Nach 4 Tagen Kokultivierung war bei den ADMA stimulierten DZ, im Vergleich zu den Kontrollzellen ein deutlicher Anstieg der CD3 positiven T-Zellen zu sehen (ADMA 1 µM: +56 %;  $p < 0.0007$  und ADMA 5 µM: +28 %;  $p < 0.02$ ).



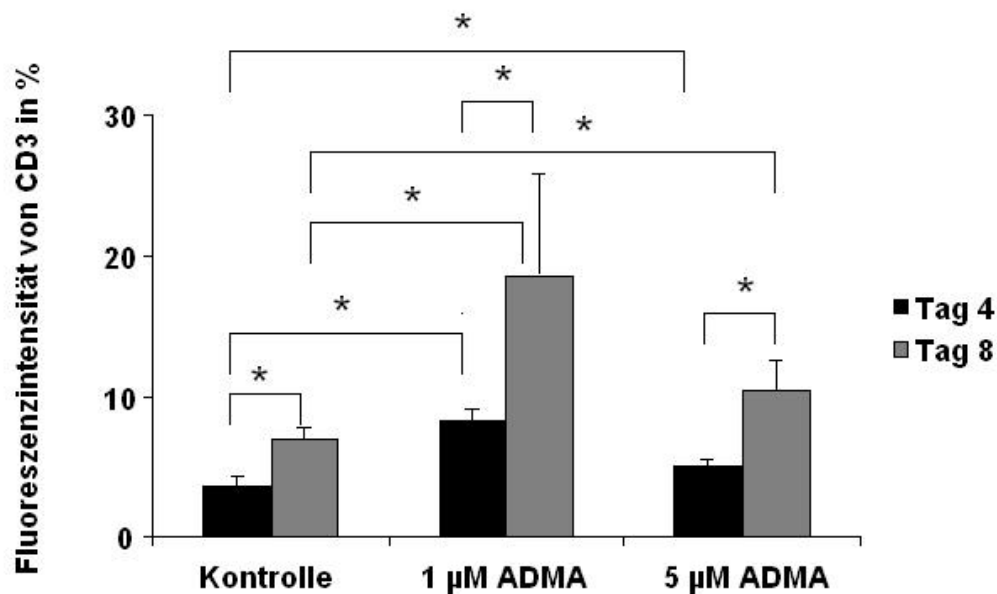
**Abbildung 35: Nachweis von CD3 positiven T-Zellen nach 4 Tagen.** Fluoreszenzintensität von CD3 positiven T-Zellen nach einer viertägigen gemischten autologen Lymphozytenreaktion. Es zeigte sich eine signifikant zunehmende Aktivierung der CD3 positiven T-Zellen durch ADMA verglichen zu den unstimulierten Kontrollzellen,  $p < 0.005$  und  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ .

Ein ähnliches Bild zeigte sich nach einer achttägigen Koinkubation von inaktivierten DZ und Fluoreszenz markierten PBMZ (ADMA 1 µM: +63 %;  $p < 0.02$  und ADMA 5 µM: +33 %;  $p < 0.04$ ). Zu sehen war auch, dass die Aktivierung von CD3 positiven Zellen sich fast verdoppelte (Abb.36).



**Abbildung 36: Nachweis von CD3 positiven T-Zellen nach 8 Tagen.** Fluoreszenzintensität von CD3 positiven T-Zellen nach einer achttägigen gemischten autologen Lymphozytenreaktion. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikant zunehmende Aktivierung der CD3 positiven T-Zellen unter ADMA verglichen zu den unstimulierten Kontrollzellen,  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ .

Bei dem Vergleich der Fluoreszenzintensität von CD3 positiven T-Zellen zwischen Tag 4 und Tag 8 (Abb.37) zeigte sich mit zunehmender Zeit eine stärkere Aktivierung der CD3 positiven T- Zellen, sowohl bei den Kontroll- als auch bei den mit ADMA stimulierten Zellen, ADMA 1  $\mu\text{M}$  (+56 %;  $p < 0.02$ ) und ADMA 5  $\mu\text{M}$  (+52 %;  $p < 0.001$ ).



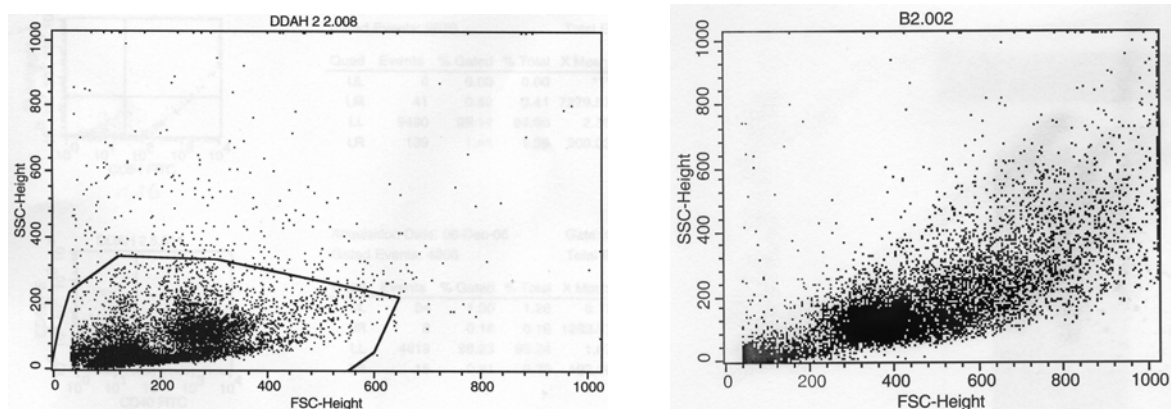
**Abbildung 37: Vergleich der positiven CD3 Expression nach 4 und 8 Tagen.** Humane immature, mit ADMA vorstimulierte DZ, wurden mit  $\gamma$ - Röntgenstrahlen inaktiviert und mit grün- fluoreszierenden autologen humanen PBMZ für 4 und 8 Tage kokultiviert. Die Expression von CD3 positiven T-Zellen wurde mittels FACS- Analyse bestimmt. Es ergab sich ein deutlich sichtbarer Anstieg von CD3 positiven T-Zellen sowohl nach 4 Tagen, als auch nach 8 Tagen. Die signifikant verstärkte Expression von CD3 positiven T-Zellen wurde zum einen durch ADMA und zum anderen durch die zeitabhängige Kokultivierung mit autologen PBMZ ausgelöst.

### 3.7 Die Bedeutung von DDAH auf die Aktivierung muriner DZ.

#### 3.7.1 FACS- Analyse muriner Knochenmarkszellen

Die geernteten Zellen wurden gewaschen und wie unter [97] beschrieben, für die FACS-Analyse vorbereitet

Zum Vergleich sind in der *Abb.38* die Punktwolkendiagramme der FACS- Analyse muriner BMZ und BMDZ dargestellt. Diagramm a) zeigt murine Knochenmarkszellen frisch nach der Isolierung und man erkennt die typischen drei Populationen. Ebenfalls auffällig ist ihre geringfügige Größe und Granulität, im Gegensatz zu den 10 Tage lang mit mGM-CSF kultivierten Zellen. Diese entsprechen nach Größe und Granulität immaturren DZ, sichtbar in Diagramm b) als schwarze abgrenzbare Wolke.



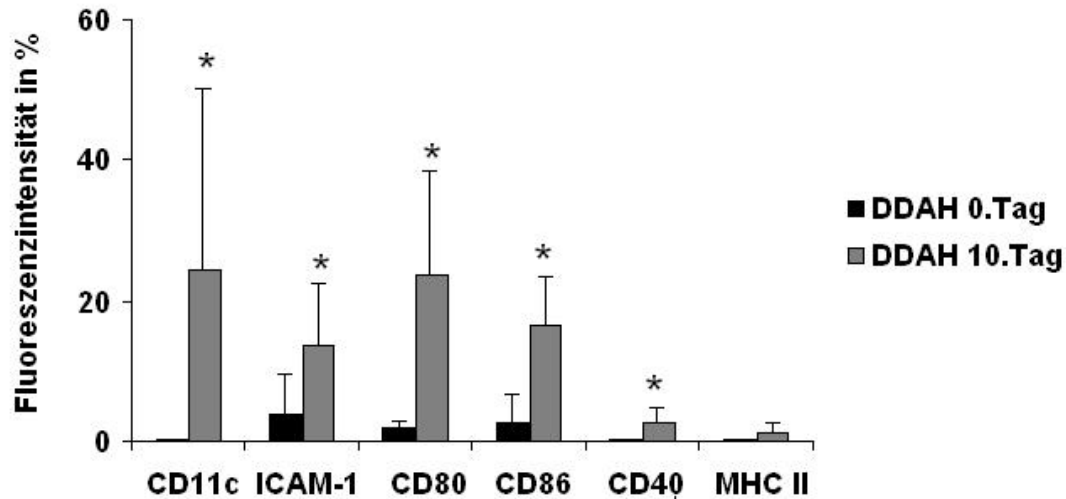
**Abbildung 38: FACS- Analyse muriner BMZ an Tag 0 und BMDZ an Tag 10.**

#### 3.7.2 Charakterisierung von DDAH-1 überexprimierten BMZ und BMDZ

Nachdem gezeigt wurde, dass ADMA die Ausreifung DZ, die Phagozytose- Aktivität und deren Aktivierung beeinflusst, sollte nun die Aktivierung DDAH-1 überexprimierender DZ untersucht werden. Um sicher zu gehen, dass nach einer 10 tägigen Kultivierung der BMZ mit murinem GM-CSF unreife dendritische Zellen entstanden sind, wurden diese mit frisch isolierten Knochenmarkszellen auf typische Dendritenmarker, wie CD11c, CD80, CD86, ICAM-1, MHC II und CD40, per FACS-Analyse untersucht und verglichen (*Abb.39*). Wie erwartet exprimierten die BMZ am Tag 0 im Gegensatz zu den BMDZ am Tag 10 nur einen Bruchteil dieser



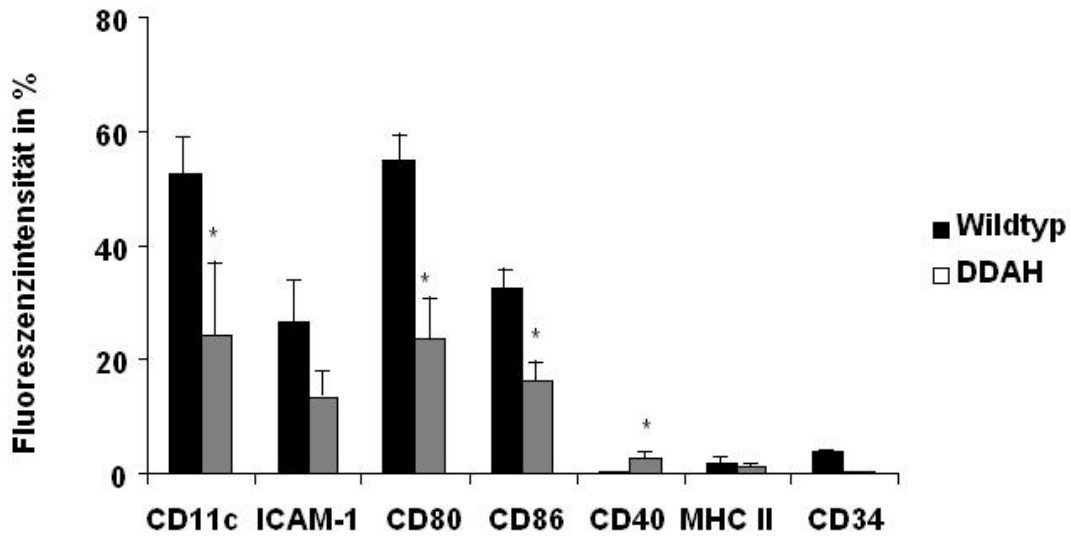
spezifischen Marker, CD11c (+99 %;  $p < 0.05$ ), CD80 (+92 %;  $p < 0.01$ ), CD86 (+85 %;  $p < 0.007$ ), ICAM-1 (+71 %;  $p < 0.05$ ), MHC II (+77 %) und CD40 (+92 %;  $p < 0.03$ ).



**Abbildung 39: Vergleich der BMZ an Tag 0 und BMDZ an Tag 10.** Charakterisierung der DDAH-1 überexprimierten BMDZ an Tag 10 anhand von verschiedenen Dendritenmarkern wie CD11c, CD80, CD86, ICAM-1, MHC II und CD40 verglichen mit BMZ an Tag 0,  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

#### 3.7.3 Charakterisierung von Wildtyp- und DDAH-1 überexprimierten BMDZ

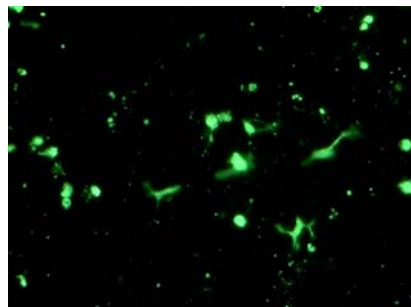
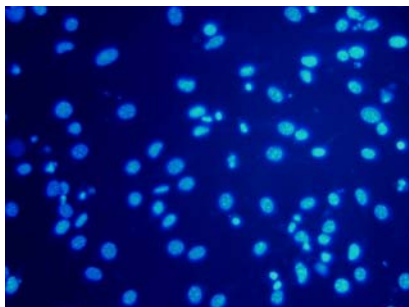
Um die Charakterisierung der BMDZ zu vervollständigen wurden Wildtyp BMDZ mit DDAH-1 überexprimierten BMDZ nach 10 tägiger Kultivierung im FACS mit einander verglichen. Diese Gegenüberstellung von Wildtyp DZ und DDAH-1 überexprimierenden DZ ließ signifikante Unterschiede erkennen (Abb.40). Es zeigte sich eine stark verminderte Expression von CD11c (-54 %;  $p < 0.05$ ), CD80 (-57 %;  $p < 0.006$ ), CD86 (-50 %;  $p < 0.008$ ) und MHC II (-40 %) auf den DZ der DDAH-1 transgenen Mäuse. Die Ausnahme machte CD40, welches mit +88 %,  $p < 0.04$  deutlich über dem Wert des Wildtyps lag.



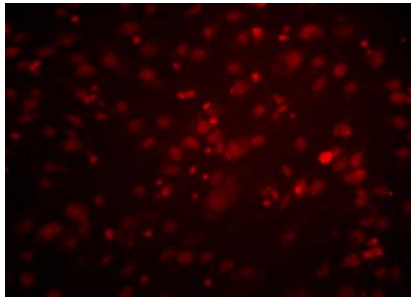
**Abbildung 40: Vergleich von Wildtyp- und DDAH-1 überexprimierten BMDZ am 10. Tag.** Charakterisierung von bestimmten Dendritenmarkern, CD11c, ICAM-1, CD80, CD86, CD40 CD34 und MHCII mittels Durchflusszytometrie.  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

#### 3.7.4 Vaskuläre Invasion von murinen DDAH-1 überexprimierten BMDZ

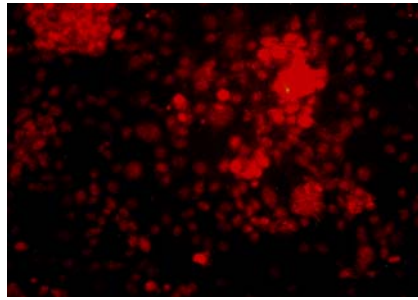
Immature mit Cell-Tracker grün- fluoreszierende BMDZ wurden mit murinen EZ kokultiviert und nach einer vorgegebenen Zeit die Adhäsionsfähigkeit der BMDZ im Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Zur quantitativen Kontrolle wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, wodurch die Zellkerne im Mikroskop als blau leuchtende Punkte erschienen (Abb.41a). Die grüne Färbung (Abb.41b) zeigt die Morphologie einzelner DZ. Die rot fluoreszierende Propidiumiodid Färbung (nach Zellmembrandenaturierung) zeigt in dunkelroter Farbe (Abb.41c) den Endothelmonolayer und als hellrot gefärbte Punkte die adhärenenten BMDZ (Abb.41d).



a) DAPI-Zellkernfärbung von BMDZ



b) Cell-Tracker gefärbte BMDZ

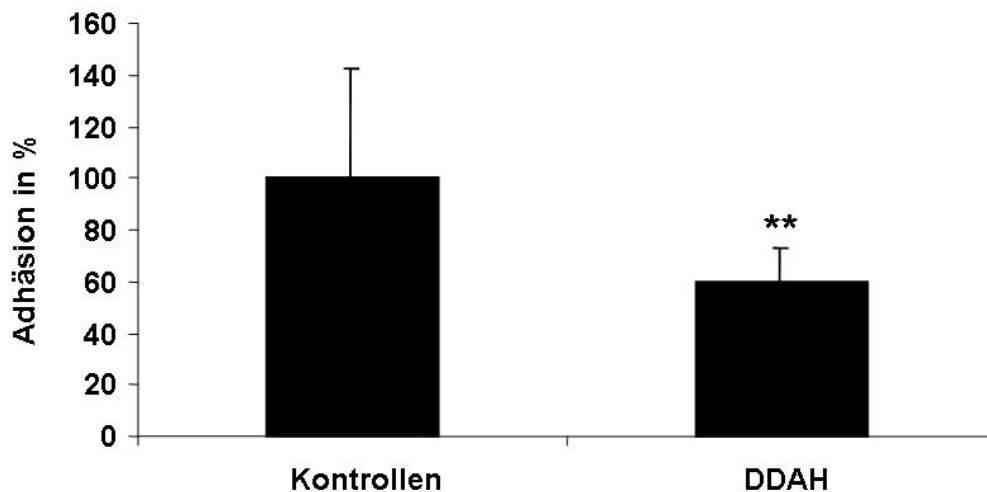


c) Endothelmonolayer mit DDAH-1-BMDZ

d) Endothelmonolayer mit Wildtyp-BMDZ

**Abbildung 41: Unterschiedlich Fluoreszenz gefärbte DZ.**

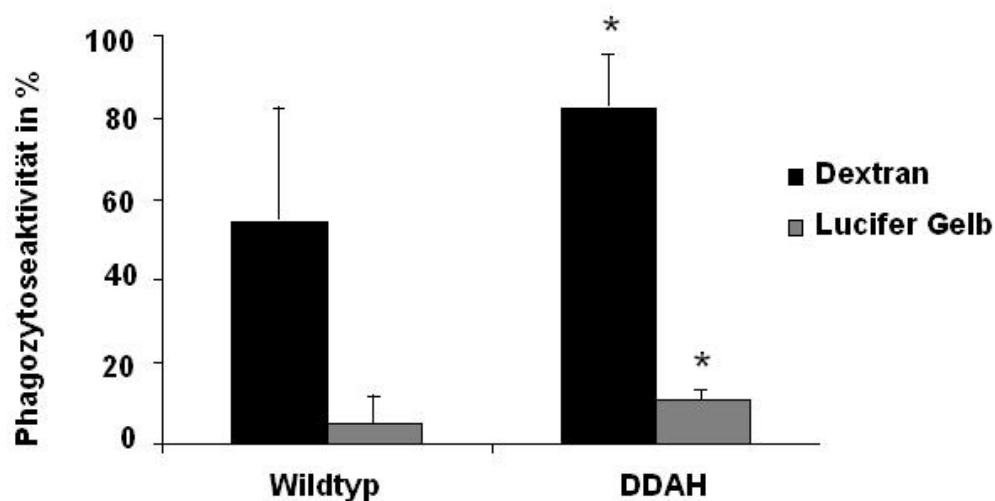
Zusätzlich wurde die Adhäsionsfähigkeit der BMDZ an autologe murine EZ mittels der Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzreader bestimmt (Abb.42). Dabei fiel auf, dass die DDAH-1 überexprimierten BMDZ eine signifikant verminderte Adhäsionsfähigkeit um -40 % (im Vergleich zu den Wildtypzellen) zeigten.



**Abbildung 42: Vaskuläre Adhäsion.** Signifikante Reduktion der vaskulären Adhäsionsfähigkeit DDAH-1 überexprimierter BMDZ im Vergleich zu Wildtyp BMDZ;  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ .

### 3.7.5 Phagozytotische Aktivität von murinen DDAH- überexprimierten BMDZ

Die Phagozytose Aktivität muriner BMDZ wurde mit derselben Methode wie unter 2.2.7 beschrieben nachgewiesen. Für den Nachweis der rezeptorvermittelten Endozytose diente wiederum FITC- Dextran und für den Nachweis der Makropinozytose Lucifer Gelb. Beide wurden in denselben Konzentrationen von 1 mg/ml eingesetzt. Die Phagozytose- Kapazität der BMDZ war anhand der Fluoreszenzintensität im FACS gut messbar (Abb.43). Entsprechend der durch ADMA induzierten reduzierten Phagozytose- Aktivität humaner DZ erkannte man bei den DDAH-1 überexprimierenden DZ eine signifikante Zunahme sowohl der rezeptorvermittelten Phagozytose- Aktivität (+34 %;  $p < 0.03$ ), als auch der Makropinozytose (+54 %;  $p < 0.04$ ). Auffallend war, dass sowohl bei den humanen Zellen, als auch den murinen Zellen eine wesentlich höhere rezeptorvermittelte Endozytose, als Makropinozytose vorhanden war.



**Abbildung 43: Rezeptorvermittelte Phagozytose und Makropinozytose.** Nachweis der rezeptorvermittelten Endozytose, mittels FITC- Dextran und der Makropinozytose, mittels Lucifer Gelb in murinen DDAH-1 überexprimierten BMDZ. Die DDAH-1 überexprimierten BMDZ zeigten im Vergleich zu den Wildtyp BMDZ eine signifikant höhere Phagozytose- Kapazität,  $p < 0.05$ ;  $n=6$ .

## 4. Diskussion

Ausgehend von der Hypothese, dass DZ entscheidend an der vaskulären Inflammation/Immunantwort beteiligt und deshalb für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen relevant sind, sollte die Bedeutung von ADMA bzw. DDAH für die Aktivierung der DZ und eine subsequente T- Zellstimulation charakterisiert werden. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie sind hier kurz zusammengefasst:

1. ADMA induziert DZ- Maturierung und reduziert die Phagozytose-Kapazität der DZ, indem es die Expression verschiedener Scavenger Rezeptoren herunterreguliert.
2. Die ADMA Freisetzung aus humanen DZ wird durch oxidativen Stress und inflammatorische Zytokine begünstigt; dies ist mit einer Beeinträchtigung der DDAH- Aktivität assoziiert.
3. ADMA verstärkt die T-Zell Proliferation.
4. DDAH-1 überexprimierende BMDZ zeigen einen verstärkten immaturren Phänotyp, verbunden mit einer verstärkten Phagozytose- Kapazität und einer verminderten vaskulären Adhäsionsfähigkeit.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ADMA Dysregulationen dendritischer Zellfunktionen (und T-Zellaktivierung) induziert, welche zur Entstehung der Atherosklerose beitragen könnten.

### 4.1. Charakterisierung humaner myeloider DZ aus Vollblut

DZ gehören zu den stärksten antigen-präsentierenden Zellen mit der einzigartigen Fähigkeit die angeborene und adaptive Immunantwort aber auch die immunologische Toleranz zu modulieren [20]. Durch ihre wichtige Funktion das Immunsystem zu kontrollieren, sind sie folgerichtige Ziele in der Transplantationsmedizin, bei allergischen Reaktionen und Autoimmunkrankheiten, sowie bei der Herstellung von Impfstoffen [98]. Obwohl DZ in kleinen Mengen in den normalen Gefäßwänden

lokalisiert sind, steigt ihre Anzahl in atherosklerotischen Gefäßwänden erheblich an [99], so dass vorangeschrittene atherosklerotische Plaques mit einwandernden DZ angereichert werden [21].

Abhängig von dem zellulären Milieu, wie dem Inhalt und der Zusammensetzung endothelialer Zytokine und Chemokine, wandern Monozyten im frühen Stadium der Entwicklung atherosklerotischer Plaques aus dem Blut durch den luminalen endothelialen Monolayer ins Gewebe ein. Bei zunehmender Ausreifung infiltrieren die Monozyten den Plaque durch Neovaskularisierung und differenzieren entweder zu Makrophagen, späteren Schaumzellen, oder DZ [31]. Im allgemeinen exprimieren die von CD34 positiven Vorläuferzellen abstammenden myeloiden immaturen DZ folgende Marker, wie BDCA-1, CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD1a<sup>+</sup> [22, 100, 101]. Erst im muren Stadium steigt die Expression der kostimulatorischen (CD80, CD86) und Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD54), sowie des Reifemarkers CD83 und HLA-DR um ein Vielfaches an [31]. DZ können durch verschiedene proatherogene Faktoren, wie z.B ox LDL, inflammatorische Zytokine oder Nikotin aktiviert werden, die auch für die Differenzierung von Monozyten zu immaturen DZ verantwortlich sind [102]. Die Expression von CD80, CD83 und CD86 ist für die stimulatorische Funktion DZ von größter Bedeutung [103], obwohl Lechmann und Mitarbeiter bereits zeigen konnten, dass die extrazelluläre Domäne von CD83 die DZ-vermittelt T-Zell-Proliferation inhibiert [104] und somit eine DZ-vermittelte T-Zell-Immunantwort unterbunden ist. So führt die effektive Aktivierung von DZ durch LPS einerseits zur Ausreifung der Zellen und andererseits zu einer massiven Produktion von proinflammatorischen/proatherogenen Zytokinen, welche die proatherogenen Prozesse stetig vorantreiben. Die soeben beschriebenen Effekte konnten in dieser Arbeit mit DZ unter dem Einfluss des endogenen Inhibitor der NO- Synthase ADMA nachgewiesen werden, da sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86) und des typischen Reifemarkers CD83 ergab, Aufgrund dieser Erkenntnisse, dem proatherogenen Effekt von ADMA und der großen immunmodulatorischen Fähigkeiten dendritischer Zellen, schreibt man ihnen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu [105].

### **4.1.1 Einfluss von ADMA auf die Phagozytose- Aktivität und endozytische Moleküle humaner DZ**

Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass ADMA die DZ- Maturierung induziert, einhergehend mit einer verminderten rezeptorvermittelten Phagozytose, Makropinozytose und einer reduzierten Expression von Scavenger Rezeptoren. Diese ADMA vermittelten Effekte könnten in einer verringerten Antigenaufnahme, z.B. von oxLDL, welches eine Rolle bei der Monozyten Rekrutierung und Schaumzellbildung spielt, einem Meilenstein von „Fatty Streaks“ und atherosklerotischen Plaques, resultieren [2]. Einige Studien identifizieren endogenes oxLDL als eines der wichtigsten Autoantigene in der zellulären Immunantwort der Atherosklerose. [31]. Die Aktivierung des Endothels durch oxLDL induziert vaskuläre Adhäsion und Monozytenrekrutierung in der Arterienwand und führt zur Akkumulation von Makrophagen und T-Lymphozyten [106]. Alderman und Mitarbeiter zeigten, dass DZ unter dem Einfluss von leicht oxidiertem LDL aktiviert werden und maturieren und mit einer kontinuierlichen T-Zell-Stimulation eine chronische Immunantwort auslösen. Überraschenderweise führt hoch oxidiertes LDL zum Absterben DZ, wodurch die T-Zell-Aktivierung limitiert wird [107]. Gegensätzlich zu den in dieser Studie erlangten Daten beschreiben Smirnova und Mitarbeiter eine ADMA induzierte Hochregulation des Scavenger Rezeptors LOX-1 in Makrophagen, die sowohl zu einer vermehrten Aufnahme von oxLDL und somit zu einer Transformation von Makrophagen zu Lipid geladenen Schaumzellen, als auch zu einer endothelialen Aktivierung führt [108]. In Makrophagen begünstigt eine iNOS Induktion mit folglich erhöhter NO- Produktion das Zellsterben von Lipid geladenen Makrophagen. Man geht davon aus, dass die akkumulierte Schaumzellbildung, hervorgerufen durch ADMA, verbunden mit einer iNOS Inhibierung, die apoptotische Wirkung gegenüber Lipid geladenen Makrophagen verhindert. Dies ist vermutlich ein Mechanismus für eine ADMA induzierte, beschleunigte Form der Atherosklerose in Patienten mit chronisch renalen Erkrankungen, charakterisiert durch die verstärkte Expression von LOX-1 und vermehrter Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen. Ebenfalls verantwortlich für die Aufnahme von oxLDL ist der Scavenger Rezeptor CD36, der vor allem in Patienten mit Typ-2 Diabetis signifikant hochreguliert ist. [109]. Da eine verfrühte atherosklerotische Erkrankung bei Patienten mit Typ-2 Diabetes die kardiovaskuläre Ereignisrate steigert, ist die Expression von CD36 ein relevanter Marker für die Atherosklerose [110].

Wie bereits im Verlauf dieser Arbeit beschrieben sind nur immature DZ in der Lage große Mengen verschiedenster Antigene zu phagozytieren. Mit zunehmendem Reifegrad büßen sie diese Fähigkeit ein, wodurch die Expression ihrer phagozytotischen Moleküle deutlich sinkt, und sie gleichzeitig zu effektiven Antigen präsentierenden Zellen ausreifen. Immature DZ können Antigen sowohl über Makropinozytose mit Hilfe spezieller Aquaporine, [111], als auch durch rezeptorvermittelte Phagozytose aufnehmen. Ein weiterer Beweis für die verminderte Phagozytose- Aktivität, verursacht durch ADMA, ist die Herunterregulation der Scavanger Rezeptoren und des Mannose Rezeptors auf DZ. Die beiden Multilektine Dec205 und der Mannose Rezeptor, welche sich beide auf DZ befinden und strukturell sehr ähneln, reagieren auf eine ADMA ausgelöste Maturierung unterschiedlich. Entsprechend seiner Funktion mannosylierte, fremde Antigene aufzunehmen und diese T-Zellen zu präsentieren [112], wird die Expression des Mannose Rzeptors unter dem verstärkten Einfluss von ADMA und der damit verbundene Ausreifung der DZ, vermindert. Gleichzeitig erhöht sich die Expression von Dec205, ein potentiell Zeichen dafür, dass Dec205 kein antigenaufnehmender Rezeptor ist, sondern andere Funktionen besitzt, die nicht mit einer Antigenaufnahme assoziiert sind [113], [114]. Durch ihre Fähigkeit fremde Antigene zu binden und deren Prozessierung einzuleiten, stellen Scavanger Rezeptoren eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar [115].

### 4.1.2 Aktivierung von CD3 positiven T-Zellen durch ADMA

Es gibt verschiedene Mechanismen die zur Aktivierung und Ausreifung der DZ beitragen. Zum einen sind eine Reihe von Rezeptoren für mikrobielle Produkte, Zytokine und T-Zellen dafür verantwortlich [116] und zum anderen können TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zur Maturierung beitragen; wodurch gleichzeitig die Ausreifung durch IL-10 inhibiert werden kann [117]. Mögliche Antigene, welche die Immunglobulininformation stimulieren, beinhalten oxLDL und HSP; letzteres kann als Antwort auf infektiöse Stimuli und infektiöse Pathogene, wie Herpesviren, Cytomegalovirus und Chlamydia, auf bestimmten Zellen überexprimiert werden [3]. Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigen spielt neben den gängigen Mechanismen der DZ- Maturierung der



endogene Inhibitor der NO-Synthase ADMA eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der DZ.

Es gibt drei wichtige Zonen, in denen DZ T-Zellen aktivieren. Als erstes die Region der Neovaskularisierung, welche mit inflammatorischen Infiltraten innerhalb der atherosklerotischen Läsionen verbunden ist. Das zweite Areal in denen DZ T-Zellen aktivieren, stellt die Adventitia dar, in der inflammatorische Infiltrate akkumulieren. Eine wichtige dritte Region für die DZ- T-Zell- Interaktion ist die Verbindung zwischen Lymphknoten und Arterienwand [21]. Nach dem Kontakt mit DZ werden T- Zellen aktiviert, prozessieren und präsentieren Antigene wie oxLDL, HSP60 und Komponenten von lokalen Mikroorganismen im atherosklerotischen Plaque [8]

Eine wichtige funktionale Folge der ADMA-induzierten DZ- Differenzierung ist, dass ADMA die DZ-induzierte T-Zell Aktivierung fördert. Geringe Konzentrationen von ADMA (1 $\mu$ M) führten in einer autologen gemischten Lymphozytenreaktion zu einer signifikanten Hochregulation der CD3 positiven Zellen sowohl nach vier, als auch acht Tagen der Kokultivierung. Konzentrationen von 5  $\mu$ M führten nicht zu einer weiteren DZ-induzierten CD3 positiven T-Zell Proliferation. Es wäre möglich, dass bereits niedrige Konzentrationen von ADMA die T-Zellreifung durch DZ beschleunigen und so für die Akkumulation von T-Zellen und deren Reifegrad innerhalb der Plaques relevant sein könnte.

Da ADMA die T-Zell Aktivierung verstärkt fördert und sofern die gebildeten T-Zellen TH1 Zellen sind könnte die erhöhte T-Zell Proliferation, die vaskuläre Immunantwort verschlimmern, da die TH1 Immunantwort proatherogen ist und auf diese Weise an der Progression der Atherosklerose nicht nur durch die Bildung proinflammatorischer Zytokine, sondern auch durch die Regulation der B-Zell Funktion und deren Antikörper Produktion, beteiligt ist [118].

### **4.2 Auswirkung von oxidativem Stress und Inflammation auf humane DZ**

Kantengwa und Mitarbeiter demonstrieren in ihrer Veröffentlichung eine durch reaktive Sauerstoffradikale ausgelöste DZ- Maturierung, assoziiert mit einer verstärkten Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 und einer gleichzeitig verminderten endozytotischen Aktivität [119]. Sicher ist, dass derartige

mikro umweltbedingte Gewebeschäden als Signale und potentielle Aktivatoren DZ fungieren und diese infolge ihrer Ausreifung zur Migration in sekundäre lymphoide Organe anregen, in denen sie entsprechend ihrer Funktion die adaptive Immunantwort auslösen [120]. Erst kürzlich konnten Weis und Mitarbeiter zeigen, dass der endotheliale NO- Inhibitor ADMA die Adhäsions- und Transmigrationsfähigkeit DZ verstärkt, dieser Prozess durch die Gabe von L-Arginin jedoch reversibel ist [33]. ADMA, welches aus der Hydrolyse von posttranslational methylierten Proteinen entsteht, kann möglicherweise proatherogene Effekte auslösen, wie die Inhibierung endothel- abhängiger Vasodilatation verbunden mit einer gesteigerten Vasokonstriktion [121]. Alle kardiovaskulären Risikofaktoren oder Marker, die bisher untersucht wurden, sind mit erhöhten Plasma ADMA-Konzentrationen assoziiert [4, 67]. In diesen Patienten korreliert die Plasma ADMA-Konzentration mit endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose [122]. Wie die neusten Ergebnisse zeigen, können DZ zu erhöhten ADMA- Konzentrationen beitragen. Unter dem Einfluss von oxidativem Stress oder Inflammation sind humane DZ in der Lage eigenständig ADMA zu sezernieren, verbunden mit einer reduzierten DDAH- Aktivität, welches ein oxidationssensitives Enzym ist [123].

Obwohl die geringe Bioverfügbarkeit von NO die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion, vaskulären Läsionen und Initiierung und Progression der Atherosklerose beschleunigt, ein Meilenstein der kardiovaskulären Erkrankungen ist und hauptsächlich durch ADMA, den endogenen Inhibitor der NOS, ausgelöst wird, stellte sich dennoch die Frage, ob es immer sinnvoll ist, die ADMA- Konzentration zu minimieren. Es gibt einige Situationen, in denen NO in exzessiver Weise gebildet wird und damit zytotoxische Wirkung besitzt. In diesen Fällen scheint ADMA der limitierende Faktor für die NO- Synthese zu sein. Diese betrifft vor allem neuronale Erkrankungen [124].

### **4.3 Zytokin induzierte Expression von NO**

Das interzelluläre Zusammenspiel von DZ, T-Lymphozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen induziert eine Reihe von stimulatorischen Zytokinen, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und INF $\gamma$ , sowie Wachstumsfaktoren, welche funktionelle und strukturelle vaskuläre Veränderungen hervorrufen [125]. Stickstoffmonoxid ist ein gasförmiger,

kurzlebiger intrazellulärer Botenstoff, der in Blutgefäßen, vor allem aber im Endothel über die NO- Synthase gebildet wird. NO wirkt auf verschiedene Targetzellen und zwar sowohl akut, über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen GMP-Gehalts, vasodilatorisch und antithrombotisch, als auch über Langzeitmechanismen, als wichtiges lokales vasoprotektives Gewebehormon. Bei vielen Gefäßerkrankungen, wie z.B. endothelialer Dysfunktion oder Entzündungen, liegen klinisch relevante Fehlregulationen der Bildung oder Wirkung von NO vor. [46]. Der Verlust der NO- Aktivität beschleunigt die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und vaskulärer Läsionen, sowie die Initiierung und Progression der Atherosklerose [58]. Je nach Stimulation der NO- Synthase bewegt sich die Wirkung von NO in physiologisch regulierbaren Bereichen oder es erfolgt eine pathologisch gesteigerte NO- Synthase. Neben der vom Organismus erwünschten Reaktion, kommt es zusätzlich zu toxischen Veränderungen auf zellulären Strukturen und zur Bildung toxischer NO- Folgeprodukte. Die Art der Wirkung von NO, als Transmitter oder Modulator und Mediator der immunologischen Abwehr oder als potentiell toxischem Molekül, hängt von der NO- Konzentration, von der Isoform des aktivierten Enzyms, von der Stärke der Stimulation und der Möglichkeit die Reaktion zu regulieren ab. Der Übergang vom physiologischen zum pathologisch- toxischen Effekt erfolgt fließend. Neben den vasodilatorischen und anti- atherosklerotischen Effekten kann ein Überschuss von NO für das Immunsystem äußerst schädlich sein. Besteht eine reduzierte Verfügbarkeit von L-Arginin, dem Substrat der NO- Synthase, entstehen Superoxide und die NOS, NADPH- Oxidase und auch andere Enzyme oxidieren NO zu hochreaktiven zytotoxischen freien Radikalen [126]. Im Falle einer Sepsis, einem inflammatorischen Prozess, der durch eine Vielzahl kardiovaskulärer Ereignisse charakterisiert ist und meist mit einem Multiorganversagen endet, besteht eine akute Überproduktion von NO. Diese exzessive Produktion von NO wird durch eine zytokin- abhängige Transkription von iNOS verursacht, wobei Zytokine durch LPS, oder andere bakterielle Produkte stimuliert werden und die iNOS- Synthese hochregulieren. Da die Bildung von NO ein wichtiges Werkzeug aktivierter Immunzellen ist, konnte iNOS auch in DZ identifiziert werden [54, 127]. Mit dem inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  stimulierte Zellen zeigen eine explizite zeitabhängige Hochregulation von iNOS, das zu einer verstärkten Produktion von NO führt. NO, welches durch eNOS gebildet wird agiert im kardiovaskulären System als Vasodilator, wohin gegen das durch iNOS induzierte NO zytotoxische oder

zytostatische Effekte auf das Immunsystem ausübt [128]. Eine Konsequenz des zu viel gebildeten NO ist die Reduktion der gesamten systemischen vaskulären Resistenz [126, 129]

### **4.4 Die Bedeutung von DDAH auf die Aktivierung muriner DZ**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten aus murinem Knochenmark isolierten Zellen DZ zu generieren. So zeigen DZ, welche nur in Gegenwart von GM-CSF kultiviert werden einen konstant immatures Phänotyp. Verglichen mit nur in GM-CSF differenzierten DZ, führt die Zugabe von IL-4 zu einer verstärkten Ausreifung der Zellen. Folglich ist sowohl die Expression der MHC-II Antigene als auch der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den mit GM-CSF und IL-4 kultivierten DZ höher [130]. Dayoub und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie mit DDAH-1 überexprimierten Mäusen zeigen, dass diese transgenen Mäuse sowohl stark reduzierte Plasma ADMA- Konzentrationen, als auch eine erhöhte Gewebe NOS- Aktivität, sowie einen geringeren Blutdruck aufwiesen [85]. Aufgrund dieser Ergebnisse unterstützten sie die Hypothese, dass Methylarginine endogene Regulatoren der NOS- Aktivität sind und Veränderungen im Metabolismus der Methylarginine die NO- Synthese und Produktion beeinflussen. Es hat sich herausgestellt, dass das Enzym DDAH ein entscheidender Modulator der intra- und extrazellulären ADMA- Konzentration ist. So zeigten einige Studien, dass eine Inhibierung der DDAH- Aktivität zu erhöhten ADMA Akkumulationen und vaskulären Schäden führte. Das Gegenteil wurde beobachtet bei einer Überexpression des Enzyms DDAH [131]. Diese Daten unterstützen die These, dass eine verminderte DDAH- Aktivität zu erhöhten ADMA- Konzentrationen und endothelialer vasodilatatorischer Dysfunktion im Verlauf der Atherosklerose führen könnte. Diese wurden durch Studien mit DDAH-1 transgenen Mäusen verifiziert.

Dazu wurden DDAH-1 überexprimierte murine Knochenmarkszellen, sowie Kontrollzellen vom Wildtyp über einen Zeitraum von 10 Tagen nur mit GM-CSF zu immatures DZ kultiviert. Die Charakterisierung der DZ der transgenen Mäuse an Tag 0 und 10 mittels Durchflusszytometrie, ergab eine signifikante Hochregulierung der typischen Dendritenmarker, CD11c, ICAM-1, CD80, CD86, CD40 und MHC-II. Eine Gegenüberstellung von Wildtyp und DDAH-1 überexprimierten DZ zeigte eine klar

verminderte Expression der eben erwähnten Oberflächenmoleküle. Die geringe Expression von MHC-II ist auf die ausschliessliche Kultivierungsmethode mit GM-CSF zurück zu führen. Es ist bekannt, dass im Gegensatz zu DZ- Vorläufern und immaturen DZ, eine Untergruppe dieser fast MHC-II negativen DZ eine große endozytotische Kapazität besitzt [132], wie es sich auch in dieser Arbeit herausstellte. Die Ergebnisse der FACS- Analyse sind ein Indiz für den weitaus immaturen Phänotyp der transgenen DZ, im Vergleich zum Wildtyp. BMDZ isoliert aus DDAH-1 transgenen Mäusen, welche geringe Gewebe- und Plasma ADMA-Konzentrationen aufwiesen, zeigten verglichen mit den Wildtyp- DZ ebenfalls eine signifikant reduzierte Adhäsionskapazität, sowie eine verstärkte rezeptorvermittelte Phagozytose- Aktivität, welches wiederum ein Hinweis auf die weniger schnelle Ausreifung dieser Zellen war. Diese Untersuchungen veranschaulichten, dass geringe Veränderungen im Metabolismus von ADMA, sowie dessen Plasma Konzentrationen, signifikante Effekte auf die NO- Synthese und kardiovaskuläre Erkrankungen hatten. Möglicherweise könnten therapeutische Modulationen der ADMA- Konzentrationen in Form von pharmakologischen oder genetischen Modifikationen eine neue Strategie für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sein.

### **4.5 Die Rolle des ADMA/NO- Systems für die Immunregulation**

Als Mediator zwischen Blut und den darunterliegenden Gefäßmuskelzellen übernimmt das über die konstitutive NOS, aus L-Arginin, gebildete NO eine wichtige Funktion. Es wird sowohl luminal als auch abluminal, jedoch konstitutiv gebildet. Die luminal Freisetzung deaktiviert Thrombozyten und verhindert dadurch die Adhäsion und Aggregation dieser Zellen, sowie die der Monozyten. Die abluminale Sekretion verursacht in den glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasodilation, welche über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und Bildung von cGMP vermittelt wird [10]. NO verfügt somit über zahlreiche günstige Effekte wie Vasodilatation, antientzündliche, antiproliferative, antiatherogene und antithrombotische Wirkung. Zusätzlich erfüllt NO sowohl im Immunsystem, als auch in anderen Organsystemen eine Vielzahl von wichtigen Aufgaben. Zum einen produzieren und reagieren neben

Makrophagen viele Immunzellen auf NO, zum anderen operieren alle drei bekannten Isoformen der NOS (eNOS, iNOS und cNOS) innerhalb des Immunsystems. Die Aktivität von NO ist nicht einzig auf dessen Entstehungsort begrenzt, sondern aufgrund seiner gasförmigen Beschaffenheit in der Lage weiträumig durch den Körper, an seinen Zielort zu diffundieren. Im Gegensatz zu Zytokinen, kann NO nicht nur mit einem Rezeptor, sondern sowohl mit anorganischen und prosthetischen Molekülen, als auch mit Proteinen und DNA-Strukturen in Interaktion treten [54].

Mittlerweile ist bekannt, dass bei einigen Infektionskrankheiten iNOS gegensätzlich wirkt und somit eine exzessive Immunreaktion unterbindet. Dadurch wird eine Autoimmunität verhindert und NO wirkt als inter- und intrazelluläres Signalmolekül, welches die Immunantwort steuert [54]. Zusätzlich weiß man heute, dass nNOS und eNOS an wichtigen immunologischen Prozessen, wie Apoptose, Zelladhäsion, Autoimmunität und antimikrobieller Abwehr beteiligt sind.

Aufgrund der Fähigkeit Apoptose zu induzieren (15) und dem Vorkommen von iNOS in Stroma Zellen des Thymus, könnte NO ebenfalls eine Rolle als Effektormolekül bei der Selektion und Entwicklung von T-Zellen spielen [54].

Sowohl das Endothel als auch dessen Produkt NO sind bei vaskulären Erkrankungen sogenannte Schlüsselregulatoren, wobei NO endothel-abhängige Vasodilation vermittelt und dabei den vasokonstriktischen Effekten von Angiotensin II und Endothelin entgegenwirkt [66]. Wird dieses Gleichgewicht durch die allgemein bekannten Risikofaktoren vaskulärer Erkrankungen zerstört, ist die Bioaktivität und Verfügbarkeit von NO erheblich beeinflusst. Dies spiegelt sich in der Reduktion der NO- Halbwertszeit, der Sensibilität für NO, der NOS- Expression und der verminderten NOS- Aktivität wieder [67]. Im Falle der Hypercholesterolämie, welche endothelialen oxidativen Stress hervorruft, wird das Endothel durch die Bildung von Superoxiden nachhaltig geschädigt. Diese Abnormalität wird gleichermaßen mit der Entstehung von Atherosklerose und deren Risikofaktoren assoziiert [61]. Die Inhibierung bzw. inadäquate Produktion von NO auf unterschiedliche Reize, einhergehend mit einer dearrangierten endothel-abhängigen Vasorelaxation, einer verstärkten Adhäsion und Transmigration von Monozyten sowie erhöhten Plättchen Aggregation und Hochregulation des LOX-1 Rezeptors [133], ist das Hauptmerkmal der endothelialen Dysfunktion. Diese ist aus kardiovaskulärer Sicht insofern von Relevanz, da sie in der Atherogenese, aber auch bei vielen anderen kardiovaskulären Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielt.

Die reduzierte NO Bioverfügbarkeit kann auf Basis einer reduzierten NOS, einer verminderten Speicherung im Endothel oder eines beschleunigten Abbaus entstehen [134]. Die verringerte NOS kann einerseits auf einem NOS- Defizit, andererseits auf einem Substrat- Mangel beruhen. Bei vermindertem Vorkommen des Substrats L- Arginin, oder des NOS Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH4), ist das bevorzugte Substrat der NOS nicht das L-Arginin, sondern Sauerstoff, wodurch vermehrt schädliche Superoxidradikale freigesetzt werden [61]. Gerade den Kofaktoren NADH und FAD, insbesondere aber BH4 wird in der Atherogenese eine essentielle Bedeutung beigemessen. Im Rahmen der Atherosklerose kommt es durch den Mangel an NO und damit verbundenen Anstieg des endogenen NOS- Inhibitor ADMA zu einem verstärkten BH4 Mangel, assoziiert mit einer reduzierten NO- Produktion und einem Anstieg von Superoxid- Anionen und Peroxinitrit. Peroxinitrit führt zu einer weiteren Abnahme von BH4, bei gleichzeitiger Zunahme von ADMA. Dadurch wird ein sogenannter „Circulus Vitiosus“ ausgelöst, der bei der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose essentielle Bedeutung hat [132].

Eine weitere Folge erhöhter Plasma ADMA Konzentrationen ist die Stimulation proatherogener Faktoren, welche u.a. zur verstärkten Adhäsion und Infiltration von Monozyten und Makrophagen führt. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, beeinflusst ADMA die Aktivierung von DZ erheblich. Zum einen führt ADMA zu einer schnelleren Maturierung, welche mit der verminderten Phagozytose- Kapazität und Herunterregulation der Scavenger Rezeptoren korreliert. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen von ADMA ausreichen die DZ vermittelte CD3 positive T-Zellreifung voran zu treiben.

Diese Daten zeigen, dass das ADMA/DDAH- System eine entscheidende Rolle für die vaskuläre Inflammation, Immunaktivierung und mögliche atherosklerotische Progression spielt. Ein Ungleichgewicht zwischen ADMA und NOS- Aktivität könnte in einer endothelialen Dysfunktion mit reduzierter NO- Produktion und verstärkter inflammatorischer Immunantwort resultieren. Einige Studien deklarierten ADMA als Todesursache als sie herausfanden, dass hohe ADMA- Konzentrationen bei schwer kranken Menschen zum Tode führten [135]. Desweiteren konnten Zoccali und Mitarbeiter beweisen, dass sowohl Atherosklerose als auch chronisch renale Erkrankungen unabhängig voneinander zu einer erhöhten Plasma- ADMA-

Konzentration führen und somit ADMA ein Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose sein könnte [136].

Abschliessend wird die Maturierung, vaskuläre Invasion, phagozytotische Kapazität und T-Zell Aktivierung humaner DZ durch ADMA dysreguliert und könnte zur proinflammatorischen vaskulären Immunantwort beitragen.



## 5. Zusammenfassung

### **Hintergrund und Studienziele:**

Atherosklerose ist eine chronische, entzündliche und multifaktorielle Erkrankung der Gefäßwand, die klinisch in der Manifestation der koronaren Herzerkrankung (KHK) oder des akuten Koronarsyndroms kulminiert. Die komplexe Erkrankung basiert auf humoralen und zellulären Immunmechanismen als Reaktion auf die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Auto- Immunreaktionen.

Immunzellen wie T-Zellen, Monozyten und auch Dendritische Zellen (DZ) werden vom Blutstrom in die atherosklerotischen Läsionen rekrutiert, wo sie für die Progression und Destabilisierung atherosklerotischer Plaques verantwortlich sind. DZ spielen in der Initiierung und Kontrolle der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle. Sie sind professionelle Antigen präsentierende Zellen, welche T-Zellen durch bestimmte Antigene aktivieren und dabei die vaskuläre Inflammation vorantreiben. DZ spielen in der arteriellen Gefäßwand eine wichtige Rolle bei der Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und letztendlich bei der Antigenpräsentation über ihre MHC- Moleküle. Eine endotheliale Dysfunktion als frühes pathogenetisch relevantes Ereignis der Atherogenese fördert die Invasion inflammatorischer Zellen.

Asymmetrisches Dimethylarginin, der endogene und kompetitive Inhibitor der NO-Synthase ist ein unabhängiger Risikofaktor der Atherosklerose und führt (wie bereits in Vorversuchen durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt) zu einer verstärkten Adhäsion und Transmigration von DZ.

Da die Auswirkungen von ADMA auf die Funktion der DZ weitestgehend noch unerforscht sind, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von ADMA auf die Aktivierung der DZ, deren Phagozytose- Kapazität und die Expression von Scavenger Rezeptoren sowie die Proliferation CD3 positiven T-Zellen untersucht werden. Ferner war es von Interesse, ob das ADMA metabolisierende Enzym DDAH die Aktivierung der DZ maßgeblich beeinflusst.

### **Methoden:**

Die für diese Arbeit verwendeten DZ wurden aus humanen mononukleären Zellen mit IL-4 und GM-CSF zu immaturren und mautren DZ kultiviert. Die Expression von Adhäsions- Kostimulations- Endozytose- und Scavenger- Rezeptoren, sowie die

Charakterisierung der DZ- Differenzierung, erfolgte +/- ADMA (1-10 $\mu$ M) mittels Durchflusszytometrie. Die Endozytosekapazität von FITC-Dextran (rezeptor-vermittelte Phagozytose), bzw. Lucifer-Gelb (Makropinozytose) wurde als Marker für die Phagozytose verwandt. Die ADMA Freisetzung, sowie die Aktivität des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH wurde in entsprechend stimulierten DZ mittels ELISA bestimmt. Um den Einfluss von DDAH auf DZ zu untersuchen, verwendeten wir DDAH-1 überexprimierende transgene C57/BL6J Mäuse, aus deren Hinterbeine Knochenmarkszellen isoliert und mit IL-4 und mGM-CSF über 10 Tage zu unreifen DZ generiert wurden. Die Adhäsionsfähigkeit dieser Fluoreszenz- gefärbten murinen DZ wurde in einem Fluoreszenzmeßgerät ermittelt.

### **Ergebnisse:**

Wir konnten nachweisen, dass humane DZ in der Lage sind unter oxidativem Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  eigenständig ADMA zu sezernieren, gleichzeitig verbunden mit einer reduzierten Aktivität des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH. In-vitro Versuche mit DZ und künstlich zugegebenem ADMA zeigen eine schnellere Ausreifung der Zellen, ersichtlich durch die erhöhte Expression typischer Maturierungsmarker. Als Folge der verstärkten Ausreifung durch ADMA verloren die DZ ihre Phagozytose- Kapazität, assoziiert mit einer verminderten Expression der Scavanger Rezeptoren LOX-1, CD36 und des Mannose Rezeptors.

Mechanistische Untersuchungen zur Charakterisierung der Relevanz des NO- Systems (iNOS) in humanen DZ führten zu dem Ergebnis, dass ADMA stimulierte DZ, mit zunehmender ADMA- Konzentration weniger iNOS exprimieren als Kontrollzellen. Einerseits zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion von iNOS, andererseits war es möglich mit IL-1 $\beta$  eine Zytokin- induzierte Expression von iNOS hervorzurufen (bei gleichzeitiger Abnahme der ADMA- Konzentration).

Weiterhin konnten wir darstellen, dass ADMA die DZ-induzierte T-Zellaktivierung signifikant steigert.

Da das Enzym DDAH für den Abbau von ADMA außerordentlich wichtig ist, untersuchten wir weiter dessen Rolle für die Aktivierung von DZ. Die Hypothese, dass DDAH-1 überexprimierte murine DZ genau gegensätzliche Effekte auf die Funktion der DZ ausüben, ließ sich in dieser Arbeit beweisen. So zeigen DDAH-1

überexprimierte DZ einen weniger maturen Phänotyp, eine signifikant geringere Adhäsionsfähigkeit und eine weitaus höhere Phagozytose- Aktivität.

Zusammenfassender Ausblick:

Während ADMA eine Ausreifung und Aktivierung von DZs vermittelt, kann durch DDAH- Überstimulation (und entsprechend ADMA- Reduktion) eine verringerte Ausreifung von DZs erreicht werden. Neben der verstärkten DZ- Ausreifung führt ADMA zu einer DZ- getriggerten verstärkten T-Zellaktivierung.

### **Schlussfolgerungen:**

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des ADMA/DDAH- Systems immunologische Prozesse zu regulieren und sind somit von Relevanz für vaskuläre Inflammation und Atherogenese.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rolle der angeborenen und adaptierten Immunität während der Atherogenese.....	10
Abbildung 2: Pathogenese der Atherosklerose.....	12
Abbildung 3: Zelluläre Zusammensetzung eines atherosklerotischen Plaques. ....	14
Abbildung 4: Die drei Untergruppen humaner DZ und Makrophagen.....	16
Abbildung 5: Unterschied zwischen myeloiden und plasmazytoiden DZ. ....	17
Abbildung 6: Lebenszyklus von humanen DZ.....	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer maturen DZ. ....	19
Abbildung 8: Merkmale immaturer und maturer DZ.....	22
Abbildung 9: Gegenüberstellung der drei NOS-Isoformen und der Zytochrom P450-Reduktase.....	27
Abbildung 10: Bildung von NO aus der Aminosäure L- Arginin. ....	29
Abbildung 11: Klinische Auswirkungen verbunden mit erhöhten ADMA- Konzentrationen.....	31
Abbildung 12: Chemische Strukturformeln von L-Arginin. ....	32
Abbildung 13: Schematischer Überblick über den Metabolismus von ADMA. ....	33
Abbildung 14: Aufreinigung von PBMZ über einen Ficoll- Gradienten.....	48
Abbildung 15: Die Neubauer Zählkammer.....	49
Abbildung 16: Emission von optischen Signalen. ....	53
Abbildung 17: Die Parameter von FSC und SSC. ....	54
Abbildung 18: Das optische System eines Durchflusszytometers. ....	55
Abbildung 19: Absorptions- und Emmisionsspektrum verschiedener Fluorochrome. .	56
Abbildung 20: Anordnung des Blot- Systems. ....	61
Abbildung 21: Die einzelnen Schritte einer PCR. ....	64
Abbildung 22: FACS- Analyse der hDZ. ....	73
Abbildung 23: Expression der Dendritenmarker CD83, CD80 und CD86.....	74
Abbildung 24: Rezeptorvermittelte Phagozytose humaner DZ. ....	75
Abbildung 25: Makropinozytose humaner DZ.....	76
Abbildung 26: Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LOX-1 und MR. ....	77
Abbildung 27: Reduktion der Phagozytose durch Mannan.....	78
Abbildung 28: Reduktion der Makropinozytose durch pCMBS. ....	79
Abbildung 29: Freisetzung von ADMA aus humanen DZ. ....	80
Abbildung 30: Nachweis der DDAH-Aktivität. ....	81
Abbildung 31: Induktion von iNOS durch IL1 $\beta$ .....	82
Abbildung 32: Reduktion von ADMA durch IL-1 $\beta$ . ....	83
Abbildung 33: Reduktion von iNOS durch ADMA. ....	84
Abbildung 34: Nachweis von iNOS.....	85
Abbildung 35: Nachweis von CD3 positiven T-Zellen nach 4 Tagen. ....	86
Abbildung 36: Nachweis von CD3 positiven T-Zellen nach 8 Tagen. ....	87
Abbildung 37: Vergleich der positiven CD3 Expression nach 4 und 8 Tagen.....	87
Abbildung 38: FACS- Analyse muriner BMZ an Tag 0 und BMDZ an Tag 10. ....	88
Abbildung 39: Vergleich der BMZ an Tag 0 und BMDZ an Tag 10.....	89
Abbildung 40: Vergleich von Wildtyp- und DDAH-1 über exprimierten BMDZ am 10. Tag.....	90
Abbildung 41: Unterschiedlich Fluoreszenz gefärbte DZ.....	91
Abbildung 42: Vaskuläre Adhäsion.....	91
Abbildung 43: Rezeptorvermittelte Phagozytose und Makropinozytose.....	92

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:.....	25
Tabelle 2:.....	49
Tabelle 3:.....	65

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethyl L-Arginin
BMZ	bone-marrow-derived cells
BMDZ	bone marrow derived dendritic cells
CaM	Calmodulin
CAT	Kationen Aminosäuren Transporter
CD	Cluster designation
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetat
CTL	Cytotoxische T-Zelle
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DMNQ	2.3 Dimethoxy-1.4-naphthoquinone
hDZ	humane dendritische Zellen
EDRF	Endothelium Derived Relxing Factor
ET-1	Endothelin-1
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FAD	Flavin-Adeninmononukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
cGMP	cyclisches Guanidinmonophosphat
Gy	Gray
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intracellular Adhesionmolecule
IGF	Insulin-like Growth Factor
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
LDL	low-density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
L-NMMA	L-N-Monomethylarginin
LOX-1	lectine-like oxidized low density lipoprotein receptor 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NADPH	Nikotinamid- Adeninnukleotid Phosphat

NKZ	Natürliche Killer Zellen
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	nitric oxide synthase
cNOS	konstitutive NOS
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierte NO-Synthase
nNOS	Neuronale NO-Synthase
OxLDL	oxidiertes LDL
PBMZ	Periphere Mononukleäre Blutzellen
pCMBS	p-Chloromercuribenzene-sulfonic
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SSA	Sulfurosalicylic acid
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Factor $\alpha$
VALT	Vascular-associated Lymphoid Tissue
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. [Acute coronary syndrome and inflammation. Biomarkers for diagnostics and risk stratification]. *Herz* 2004;29:769-776.
- [2] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
- [3] Lord RS, Bobryshev YV. Hallmarks of atherosclerotic lesion development with special reference to immune inflammatory mechanisms. *Cardiovasc Surg* 2002;10:405-414.
- [4] Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-833.
- [5] Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* 2006;449:96-103.
- [6] Methe H, Weis M. Atherogenesis and inflammation--was Virchow right? *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1823-1827.
- [7] Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001;22:665-669.
- [8] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508-519.
- [9] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:63-71.
- [10] Luscher TF, Tschudi MR, Wenzel RR, Noll G. [Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide)]. *Internist (Berl)* 1997;38:411-419.



- [11] Yilmaz A, Lipfert B, Cicha I, Schubert K, Klein M, Raithel D, *et al.* Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. *Exp Mol Pathol* 2007;82:245-255.
- [12] Millonig G, Schwentner C, Mueller P, Mayerl C, Wick G. The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:547-553.
- [13] Rosenfeld ME. An overview of the evolution of the atherosclerotic plaque: from fatty streak to plaque rupture and thrombosis. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 7:2-6.
- [14] Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:297-329.
- [15] Bobryshev YV. Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*;90:970-984.
- [16] Ueno H, Schmitt N, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunology and cell biology*;88:376-380.
- [17] Granucci F, Zanoni I, Feau S, Capuano G, Ricciardi-Castagnoli P. The regulatory role of dendritic cells in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134:179-185.
- [18] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-296.
- [19] Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82:97-130.
- [20] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

- [21] Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res* 1998;37:799-810.
- [22] Gluckman JC, Canque B, Rosenzweig M. Dendritic cells: a complex simplicity. *Transplantation* 2002;73:S3-6.
- [23] Zhang Y, Zhang C. Role of dendritic cells in cardiovascular diseases. *World journal of cardiology*;2:357-364.
- [24] Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999;189:611-614.
- [25] Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-16.
- [26] Ranjit S, Dazhu L. Potential role of dendritic cells for progression of atherosclerotic lesions. *Postgrad Med J* 2006;82:573-575.
- [27] Link A, Bohm M. Potential role of dendritic cells in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2002;55:708-709.
- [28] Millonig G, Niederegger H, Rabl W, Hochleitner BW, Hoefer D, Romani N, *et al.* Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:503-508.
- [29] Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 2006;37:208-222.
- [30] Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The functional role of dendritic cells in atherogenesis (Review). *Molecular medicine reports*;3:551-554.
- [31] Bobryshev YV. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur Heart J* 2005;26:1700-1704.

- [32] de la Rosa G, Longo N, Rodriguez-Fernandez JL, Puig-Kroger A, Pineda A, Corbi AL, *et al.* Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol* 2003;73:639-649.
- [33] Weis M, Schlichting CL, Engleman EG, Cooke JP. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1817-1823.
- [34] Perrins CJ, Bobryshev YV. Current advances in understanding of immunopathology of atherosclerosis. *Virchows Arch*;458:117-123.
- [35] Vanderlaan PA, Reardon CA. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects:an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005;46:829-838.
- [36] Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;50:507-529.
- [37] Kondo T, Cortese I, Markovic-Plese S, Wandinger KP, Carter C, Brown M, *et al.* Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* 2001;2:932-938.
- [38] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263-266.
- [39] Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose *Journal für Kardiologie* 2002;12:556-562.
- [40] Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, *et al.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:444-448.
- [41] Stanek B. Das kranke Endothel. *Journal für Hypertonie* 2003;7:11-16.

- [42] Gimbrone A, JN T. Biology of the vessel wall: endothelium. *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* 1999;331-348.
- [43] Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.
- [44] Bode-Boger SM. [Influence of L-arginine on development of atherosclerosis: what is the therapeutically assured?]. *Dtsch Med Wochenschr* 2005;130:593-598.
- [45] Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:23-37.
- [46] Schmidt HH, Walter U, Kochsiek K. [Formation and effects of nitrogen monoxide (NO) in the vascular system]. *Internist (Berl)* 1997;38:406-410.
- [47] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- [48] Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
- [49] Stuhlinger M. [Asymmetric dimethyl arginine (ADMA): a novel cardiovascular risk factor?]. *Wien Med Wochenschr* 2007;157:57-60.
- [50] Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96:379-382.
- [51] Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994;78:927-930.
- [52] Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
- [53] Podesser BK, Hallstrom S. Nitric oxide homeostasis as a target for drug additives to cardioplegia. *Br J Pharmacol* 2007;151:930-940.

- [54] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907-916.
- [55] Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
- [56] Stichtenoth DO. [Nitrogen monoxide. Mediator or marker of chronic inflammation?]. *Internist (Berl)* 1997;38:420-426.
- [57] Weis M, Cooke JP. Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:567-575.
- [58] Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-2037.
- [59] Böger RH B-BS, Brandes RP, . Dietary L-Arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997;96:1282-1290.
- [60] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 Suppl 12:S60-62.
- [61] Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* 2003;4:53-60.
- [62] Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, *et al.* Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-2128.
- [63] Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-3095.
- [64] Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2287-2295.

- [65] Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4:33-40.
- [66] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-32.
- [67] Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vascular medicine (London, England)* 2005;10 Suppl 1:S11-17.
- [68] Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, *et al.* Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933-938.
- [69] Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-1847.
- [70] Boger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl* 2003;4:1-3.
- [71] Valkonen VP, Laaksonen R. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin Chim Acta* 2004;348:9-17.
- [72] Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813-1818.
- [73] Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vascular medicine (London, England)* 2005;10 Suppl 1:S73-81.
- [74] Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:984-989.
- [75] Boger RH, Cooke JP, Vallance P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. *Vascular medicine (London, England)* 2005;10 Suppl 1:S1-2.

- [76] Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003;83:183-252.
- [77] Boger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1124-1129.
- [78] Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, *et al.* Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 2005;111:1431-1438.
- [79] Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023-1030.
- [80] Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a cardiovascular and renal risk factor on the move. *J Hypertens* 2006;24:611-619.
- [81] Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, *et al.* Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999;343 Pt 1:209-214.
- [82] Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-2575.
- [83] Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13527-13532.

- [84] Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC, *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation* 2005;112:1549-1556.
- [85] Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042-3047.
- [86] Cao W, Bobryshev YV, Lord RS, Oakley RE, Lee SH, Lu J. Dendritic cells in the arterial wall express C1q: potential significance in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2003;60:175-186.
- [87] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999;223:77-92.
- [88] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693-1702.
- [89] Al-Shaibi N, Ghosh SK. A novel phosphoprotein is induced during bone marrow commitment to dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:26-30.
- [90] Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, *et al.* Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1377-1383.
- [91] Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, *et al.* Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 2004;109:500-505.



- [92] Kielstein JT, Frolich JC, Haller H, Fliser D. ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1742-1745.
- [93] Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000;243:147-154.
- [94] Fernandez-Ruiz V, Lopez-Moratalla N, Gonzalez A. Production of nitric oxide and self-nitration of proteins during monocyte differentiation to dendritic cells. *J Physiol Biochem* 2005;61:517-525.
- [95] Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, *et al.* Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003;92:226-233.
- [96] Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, *et al.* Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993;233:119-125.
- [97] Mendoza L, Indrova M, Hajkova R, Reinis M, Smahel M, Vonka V, *et al.* Peritumoral administration of antigen-unstimulated bone marrow-derived dendritic cells inhibits tumour growth. *Folia Biol (Praha)* 2000;46:91-97.
- [98] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
- [99] Krams R, Segers D, Mousavi Gourabi B, Maat W, Cheng C, van Pelt C, *et al.* Inflammation and atherosclerosis: mechanisms underlying vulnerable plaque. *J Interv Cardiol* 2003;16:107-113.
- [100] Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* 1999;50:499-509.
- [101] Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S146-150.

- [102] Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2003;107:604-611.
- [103] Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology* 2005;114:204-212.
- [104] Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, *et al.* The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* 2001;194:1813-1821.
- [105] Dopheide JF, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Munzel T, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro. *Coron Artery Dis* 2007;18:523-531.
- [106] Huang YH, Ronnelid J, Frostegard J. Oxidized LDL induces enhanced antibody formation and MHC class II-dependent IFN-gamma production in lymphocytes from healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1577-1583.
- [107] Alderman CJ, Bunyard PR, Chain BM, Foreman JC, Leake DS, Katz DR. Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment? *Cardiovasc Res* 2002;55:806-819.
- [108] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, *et al.* Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 1999;99:3110-3117.
- [109] Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H782-790.

- [110] Handberg A, Levin K, Hojlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation* 2006;114:1169-1176.
- [111] de Baey A, Lanzavecchia A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* 2000;191:743-748.
- [112] Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 2005;26:104-110.
- [113] Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* 2000;12:1511-1519.
- [114] Chieppa M, Bianchi G, Doni A, Del Prete A, Sironi M, Laskarin G, *et al.* Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* 2003;171:4552-4560.
- [115] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-1890.
- [116] Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 2001;13:291-298.
- [117] Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S127-132.
- [118] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). *Annual review of immunology* 2009;27:165-197.
- [119] Kantengwa S, Jornot L, Devenoges C, Nicod LP. Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:431-437.

- [120] Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med* 2002;32:377-385.
- [121] Chen X, Niroomand F, Liu Z, Zankl A, Katus HA, Jahn L, *et al.* Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease. *Basic Res Cardiol* 2006;101:346-353.
- [122] Boger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005;10:14-23.
- [123] Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, *et al.* Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-992.
- [124] Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:159-178.
- [125] Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:205-213.
- [126] Cooke JP. Flow, NO, and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:768-770.
- [127] Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1992;267:6370-6374.
- [128] Park CS, Krishna G, Ahn MS, Kang JH, Chung WG, Kim DJ, *et al.* Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 2000;4:459-471.

- [129] Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 2002;90:373-378.
- [130] Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, *et al.* Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999;162:168-175.
- [131] Wadham C, Mangoni AA. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulation: a novel therapeutic target in cardiovascular disease. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2009;5:303-319.
- [132] Menges M, Baumeister T, Rossner S, Stoitzner P, Romani N, Gessner A, *et al.* IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc Biol* 2005;77:535-543.
- [133] Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F871-880.
- [134] Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006;4:53-65.
- [135] Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, *et al.* Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007;53:273-283.
- [136] Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, *et al.* Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-2117.

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Michael Weis bedanken. Er gab mir stets die Möglichkeit zur eigenständigen Planung und Durchführung der Experimente und war immer bereit die Ergebnisse mit mir zu diskutieren und mich zu unterstützen. Er schaffte es immer wieder, auch in schwierigen Situationen, mich aufs Neue zu motivieren und die Dinge positiv zu sehen.

Bei Prof. Dr. med. G. Steinbeck möchte ich mich für die Übernahme der Arbeit an die Medizinische Klinik und Poliklinik I der LMU, bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Wolfgang Siess, der mir durch die Aufnahme in das DFG geförderte Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin“, sowohl durch die finanzielle Unterstützung, als auch durch die Teilnahme an dem hervorragendem Programm dieses Kollegs, die Möglichkeit gab zu promovieren.

Unserer technischen Assistentin Cornelia Grimm danke ich sehr für die hilfsbereite Einarbeitung, labortechnische Unterstützung und ihre immer bestrebten Versuche ein angenehmes Laborklima zu schaffen. Mein Dank gilt ebenso den Technischen Assistentinnen Zeljka Sisic und Judith Arcifa (aus dem Nachbarlabor), die mir immer mit hilfreichen Tipps zur Seite standen, aber auch für lustigen Gesprächsstoff außerhalb des Laborlebens sorgten.

Bei Dr. med. Sieglinde Kofler möchte ich mich neben den netten Dienstaufträgen (Herrsching, Mannheim...) auch für ihre allzeit ärztlichen Hilfeleistungen bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem Studienfreund Dipl.Biol. Marko Pavlekovic, der stets ein offenes Ohr für alle meine Probleme hatte, egal ob in wissenschaftlicher oder privater Hinsicht und meist die richtigen Worte fand, um mich wieder aufzubauen. Danke für die vielen Gesprächsabende.

Ganz herzlich danke ich meinem Freund Fabian, der mich die ganzen drei Jahre während meiner Dissertation und auch danach begleitete, alle meine Höhen und Tiefen miterlebte und immer an mich glaubte und dies auch hoffentlich weiterhin noch macht.

Meinem Bruder Fabian danke ich sehr herzlich für seine technische Unterstützung am Computer.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mir während meiner gesamten Studienzeit, besonders aber in den letzten drei Jahren zur Seite standen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützten, mir Mut zusprachen und dabei immer die richtigen Worte fanden.